



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 433 854 A2**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **90123835.2**

(22) Anmeldetag: **11.12.90**

(91) Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12Q 1/28**, C07D 471/04,  
C07D 487/04, C07D 513/04,  
/(C07D471/04,231:00,221:00),  
(C07D487/04,239:00,231:00),  
(C07D487/04,237:00,231:00),  
(C07D513/04,277:00,231:00),  
(C07D487/04,235:00,231:00),  
(C07D487/04,231:00,231:00),  
(C07D487/04,249:00)

(30) Priorität: **21.12.89 DE 3942357**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**26.06.91 Patentblatt 91/26**

(54) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

(71) Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**  
**Sandhofer Strasse 116**  
**W-6800 Mannheim 31(DE)**

(72) Erfinder: **Zimmermann, Gerd, Dr. rer. nat.**  
**Dornheimer Ring 4**  
**W-6800 Mannheim 41(DE)**  
Erfinder: **Siedel, Joachim, Dr. rer. nat.**  
**Weilheimer Strasse 10**  
**W-8139 Bernried(DE)**  
Erfinder: **Frey, Günter, Chem-Ing.**  
**Pfalzgrafenstrasse 7**  
**W-6701 Ellerstadt(DE)**

(54) **3-Aminopyrazolo-Heterocyclen, deren Verwendung zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxidbildenden Systemen, Peroxidase, peroxidatisch wirksamen Substanzen oder von elektronenreichen aromatischen Verbindungen, entsprechende Bestimmungsverfahren und hierfür geeignete Mittel.**

(57) Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von 3-Aminopyrazolo-Heterocyclen zur kolorimetrischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxid bildenden Systemen, Peroxidase, peroxidatisch wirksamen Substanzen oder elektronenreichen aromatischen Verbindungen, entsprechende Bestimmungsverfahren und hierfür geeignete Mittel.

EP 0 433 854 A2

**3-AMINOPYRAZOLO-HETEROCYCLEN, DEREN VERWENDUNG ZUR BESTIMMUNG VON WASSERSTOFF-PEROXID, WASSERSTOFFPEROXID-BILDENDEN SYSTEMEN, PEROXIDASE, PEROXIDATISCH WIRKSAMEN SUBSTANZEN ODER VON ELEKTRONREICHEN AROMATISCHEN VERBINDUNGEN, ENTSPRECHENDE BESTIMMUNGSVERFAHREN UND HIERFÜR GEEIGNETE MITTEL**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von 3-Aminopyrazolo-Heterocyclen zur kolorimetrischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid, wasserstoffperoxidbildenden Systemen, Peroxidase, peroxidatisch wirksamen Substanzen oder von elektronenreichen aromatischen Verbindungen sowie neue 3-Aminopyrazolo-Heterocyclen und ein Verfahren zu deren Herstellung.

Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxid bildenden Systemen, Peroxidase oder peroxidatisch wirksamen Substanzen mittels oxidativer Kupplung einer elektronenreichen aromatischen Verbindung mit einer heterocyclischen Verbindung.

Im übrigen betrifft die Erfindung auch ein Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxid bildenden Systemen, Peroxidase oder peroxidatisch wirksamen Substanzen durch oxidative Kupplung enthaltend eine elektronenreiche aromatische Verbindung und eine heterocyclische Verbindung.

Desweiteren betrifft die Erfindung die Verwendung eines 3-Aminopyrazoloderivates zur Herstellung eines Mittels zur kolorimetrischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxid bildenden Systemen, Peroxidase oder peroxidatisch wirksamen Substanzen durch oxidative Kupplung. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung einer elektronenreichen aromatischen Verbindung durch deren oxidative Kupplung mit einer heterocyclischen Verbindung in Gegenwart eines Oxidationsmittels.

Die Erfindung betrifft auch ein Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung einer elektronenreichen aromatischen Verbindung durch oxidative Kupplung enthaltend eine heterocyclische Verbindung und ein Oxidationsmittel.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung eines 3-Aminopyrazoloderivates zur Herstellung eines Mittels zur kolorimetrischen Bestimmung einer elektronenreichen aromatischen Verbindung durch oxidative Kupplung.

Sowohl für die analytische Chemie, als auch für die medizinische Diagnostik, ist der Nachweis von Wasserstoffperoxid mittels geeigneten chromogenen Substanzen, unter Katalyse von Peroxidase oder peroxidatisch wirksamen Substanzen wie z.B. Hämoglobin, von sehr großer Bedeutung. Dies gilt vor allem für die zahlreichen Nachweisverfahren, bei denen Wasserstoffperoxid als Zwischenprodukt gebildet und im Anschluß unter Anwesenheit geeigneter chromogener Substanzen, vorwiegend in Gegenwart einer Peroxidase (POD) als Katalysator, in eine Verbindung überführt wird, die optisch erfassbar ist und in einer quantitativen Beziehung zum gebildeten Wasserstoffperoxid steht. Weiterhin wird Peroxidase häufig als Enzym-Marker in Immuntesten verwendet und durch Zusatz von Wasserstoffperoxid und obigen chromogenen Substanzen nachgewiesen.

Als Beispiele sind nachfolgend Verbindungen genannt, die mit den in Klammer stehenden entsprechenden Oxidasen wasserstoffperoxidbildende Systeme darstellen:

Glucose (Glucoseoxidase), Galactose (Galactoseoxidase), L-Aminosäure (L-Aminosäureoxidase), Cholesterin (Cholesterinoxidase), Harnsäure (Uricase), Sarcosin (Sarcosinoxidase), Glycerin (Glycerinoxidase).

Für den Nachweis von Wasserstoffperoxid/Peroxidase sind bereits zahlreiche Chromogene bzw. Indikatorsysteme genannt und eingesetzt worden. Eines der bekanntesten ist das von Trinder (Ann. Clin. Biochem. 6 (1968), 24 - 27) beschriebene Indikatorsystem, bei dem Phenol mit 4-Aminoantipyrin in Gegenwart von POD unter Einwirkung von  $H_2O_2$  oxidativ zu einem Farbstoff gekuppelt wird. Dabei können anstelle des Phenols als Kupplungskomponente auch Phenolderivate, Anilinderivate, Naphthol, Naphtholderivate, Naphthylamin, Naphthylaminderivate oder ähnlich reagierende Substanzen treten. 4-Aminoantipyrin als Kupplungspartner kann z.B. durch Aminoantipyrinderivate, Vanilindiaminsulfonsäure, Methylbenzthiazolinonhydrazon (MBTH), sulfoniertes Methylbenzthiazolinonhydrazon (SMBTH) und ähnliche von S. Hünig beschriebene Systeme (vgl. "The chemistry of Synthetic Dyes", K. Venkataraman Ed., Vol. IV S. 189-193; Academic Press, New York San Francisco, London, 1971), substituiert werden.

In EP-A-0 033 539 wird zur Erzielung besserer Farbstabilitäten der bei der oxidativen Kupplung von 4-Aminoantipyrin mit Phenolen entstehenden Farbstoffe der Ersatz von 4-Aminoantipyrin durch 4-Aminoantipyrinderivate vorgeschlagen, die einen zweifach substituierten Phenylrest tragen. Die so erzielbaren Farbstoffe weisen  $\lambda_{max}$ -Werte im Bereich von etwa 500 - 550 nm auf.

Insgesamt besteht ein großer Nachteil der bisher beschriebenen Redoxindikatorsysteme auf der Basis

von 4-Aminoantipyrin oder N-Methylbenzthiazolinon-hydrazon darin, daß durch oxidative Kupplung mit elektronenreichen aromatischen Verbindungen, wie Phenolen oder Anilinen, Farbstoffe entstehen, deren  $\lambda_{\text{max}}$ -Werte im Bereich um  $500 \pm 50$  nm herum liegen. Oxidative Kupplungsreaktionen werden häufig angewandt bei der Analytik von Körperflüssigkeiten, wie Blut, Plasma, Serum, Harn, Speichel etc. Insbesondere bei hämolytierten Plasmen oder Seren, d. h. hämoglobinhaltigen Plasmen oder Seren entstehen aber Probleme bei Verwendung von Redoxindikatorsystemen des Standes der Technik welche oxidative Kupplungsreaktionen eingehen, die durch die relativ hohe Eigenabsorption solchen Probenmaterials im Bereich um 500 nm bedingt sind. Beeinträchtigungen der Messung sind dann um so gravierender je geringer die Konzentration des zu bestimmenden Serumbestandteils ist.

Außerdem sind viele der bekannten Redoxindikatoren wegen der durch Autoxidation bedingten Leerwertinstabilität oder der Instabilität der erzeugten Farbe bei den für die enzymatischen Reaktionen notwendigen pH-Werten von ca. 6-8 nicht für die Entwicklung einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bestimmung geeignet.

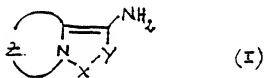
Dies trifft insbesondere auch auf das von W. Ried und E.-V. Köcher in Liebig's Ann. Chem. 647, 116 - 144 (1961) und Liebig's Ann. Chem. 647, 144 - 154 (1961) unter anderen beschriebene 2-Hydroxy-3-amino-5,7-dimethyl-pyrazolo-pyrimidin zu, das gegen Sauerstoff so unbeständig ist, daß es nicht als Reinsubstanz gewonnen werden konnte.

Trotz der Vielzahl bekannter Redoxindikatoren zum Nachweis von Wasserstoffperoxid, Peroxidase oder peroxidatisch wirksamer Substanzen wird immer noch nach solchen Verbindungen gesucht, die in möglichst vielen Testsystemen, insbesondere zur Bestimmung von Bestandteilen von Körperflüssigkeiten, einsetzbar sind, über einen breiten pH-Bereich eine gleichmäßige, hohe Empfindlichkeit zeigen und nicht durch Serumbestandteile gestört werden.

Im Rahmen der Aufgabe der vorliegenden Erfindung sollten deshalb geeignete Verbindungen bereitgestellt werden, die für die Bestimmung von Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxid bildenden Systemen, Peroxidase, peroxidatisch wirksamen Substanzen oder von elektronenreichen aromatischen Verbindungen brauchbar sind, die durch oxidative Kupplung mit Phenolen, Anilinen oder anderen Kupplern Farbstoffe liefern, deren Absorption genügend langwellig ist, um durch die Eigenabsorption von Blutplasma oder Serum nicht gestört zu werden, die den Anforderungen bezüglich Leerwertstabilität und Farbstabilität beim Maß-pH genügen und bei denen die Farbausbeute bei der oxidativen Kupplung nicht durch Blutbestandteile gestört wird.

Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung, so wie sie in den Ansprüchen charakterisiert ist, gelöst.

Es wurde gefunden, daß Pyrazoloderivate der allgemeinen Formel I



in der  
X-Y  $\text{NR}^1\text{-CO}$  oder  $\text{N} = \text{CR}^2$  bedeutet,

wobei

$\text{R}^1$  Alkyl und

$\text{R}^2$  Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkylthio, Aryl, Aralkyl, gegebenenfalls jeweils substituiert durch Hydroxy, Dialkylphosphinyl, Carboxy,  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{PO}_3\text{H}_2$ , ein Salz eines dieser Säurereste oder/und Alkoxy-carbonyl;

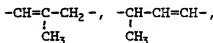
Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxy-carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist wobei, wenn Amino durch 2 Alkylreste substituiert ist, diese Reste auch zu einem Ring geschlossen sein können, der außer durch das N-Atom der Aminogruppe gegebenenfalls auch durch Sauerstoff, Schwefel oder ein weiteres Stickstoffatom unterbrochen sein kann oder Amino gegebenenfalls durch ein oder zwei Acylgruppen, Alkoxy- oder/und Alkoxy-carbonylgruppen,  $\text{H}_2\text{N-CO}$ , Alkyl-, Aralkyl- oder/und Aryl-carbamoylgruppen substituiert ist; oder

Wasserstoff, Carboxy, Alkoxy-carbonyl, Carboxamido oder Halogen ist, und

$\text{Z NR}^3\text{-N} = \text{N}$  bedeutet,

wobei  $\text{R}^3$  Alkyl oder Aralkyl ist oder

- Z eine ungesättigte Kette mit 3 bis 5 Gliedern aus Stickstoffatomen oder aus Kohlenstoffatomen und gegebenenfalls einem oder mehreren Stickstoff- oder Schwefelatomen darstellt, wobei Kohlenstoff- oder gegebenenfalls substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Aralkyl, Aryl, Carboxy, Carboxamido, Alkoxycarbonyl, Cyano, Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei
- 5 gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxycarbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist oder Halogen und wobei Stickstoffatome, die nicht über eine Doppelbindung gebunden sind, durch Alkyl oder Aralkyl substituiert sind oder zwei benachbarte Kettensubstituenten gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist
- 10 sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze zur kolorimetrischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid, wasserstoffperoxidbildenden Systemen, Peroxidase, peroxidatisch wirksamen Substanzen oder elektronenreichen aromatischen Verbindungen vorteilhaft einsetzbar sind.
- 15 Hierbei bedeutet "Alkyl" - auch in Alkylthio-, Dialkylphosphinyl-, Alkylcarbamoyl- und Aralkylresten - einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit 1-6, vorzugsweise 1-4 C-Atomen. Beispiele sind die Methyl-, Ethyl-, Propyl-, iso-Butyl- oder tert-Butylgruppe.
- Wenn eine Aminogruppe durch 2 Alkylreste substituiert ist, können diese Reste auch so zu einem Ring geschlossen sein, daß sie insgesamt einen durch ein Stickstoffatom unterbrochenen Ring darstellen.
- 20 Bevorzugt sind hierbei solche Aminogruppen, die einen insgesamt 5- oder 6-gliedrigen Ring darstellen und der seinerseits gegebenenfalls durch Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff unterbrochen ist. Besonders bevorzugt ist der Morpholinorest.
- "Alkoxy" - auch in Alkoxy- und Alkoxycarbonylresten - steht für einen geradkettigen oder verzweigten Alkoxyrest mit 1 - 6, vorzugsweise 1 - 4 C-Atomen. Beispiele sind die Methoxy-, Ethoxy-, Propyloxy-, iso-Butyloxy- oder tert-Butyloxygruppe.
- 25 "Aryl" - auch in Arylcarbamoylgruppen - bezeichnet einen Kohlenstoffaromaten- oder Heteroaromatenrest, vorzugsweise einen solchen mit 6 - 10 Ring-Atomen, insbesondere die Phenyl- und die Naphthylgruppe, die zusätzlich noch durch Alkyl, Alkoxy oder/und Halogen substituiert sein können. Besonders bevorzugt ist der Phenylrest.
- 30 Ein "Aralkyl"-Rest - auch in einer Aralkylcarbamoylgruppe - bedeutet einen Rest, bei dem eine wie vorstehend definierte Alkylgruppe durch einen wie zuvor charakterisierten Arylrest substituiert ist. Bevorzugt ist die Benzylgruppe.
- Ein "Aralkoxy"-Rest, beispielsweise in Aralkoxycarbonylgruppen, bezeichnet einen Rest, bei dem eine wie vorstehend definierte Alkoxygruppe durch einen wie zuvor charakterisierten Arylrest substituiert ist.
- 35 Bevorzugt ist die Benzoyloxygruppe.
- "Halogen" steht für die Reste Fluor, Chlor, Brom und Jod. Fluor und Chlor sind bevorzugt.
- Eine Acylgruppe bezeichnet einen Carbonsäurerest, der Alkyl-, Aralkyl- oder Arylreste enthalten kann. Bevorzugt sind Acetyl-, Phenylacetyl- oder Benzoylreste.
- Unter einer Alkylengruppe wird eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffkette aus 3 - 5, vorzugsweise 3 oder 4 C-Atomen mit zwei freien Bindungsstellen verstanden.
- 40 Beispiele sind  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ,



45  $-(\text{CH}_2)_4-$  oder  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ .

- Bevorzugt sind der Butadiendiylnrest ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ ) und der Tetramethylenrest ( $-(\text{CH}_2)_4-$ ). Ein
- 50 Alkenylrest ist ein geradkettiger oder verzweigter Kohlenwasserstoffrest aus 2-5 C-Atomen mit mindestens einer Doppelbindung. Bevorzugt ist beispielsweise der Vinylrest. Unter einer Dialkylphosphinylgruppe wird der Rest



55

verstanden, wobei Alkyl die zuvor gegebene Bedeutung hat. Bevorzugt ist der Dimethylphosphinylrest. Als Salze von  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{PO}_3\text{H}_2$  und Carboxyresten können Alkali- oder Erdalkalisalze oder Ammoniumsalze eingesetzt werden. Unter Alkalisalzen werden Lithium-, Natrium-, Kalium-, Rubidium- und Cäsiumsalze verstanden, wobei Lithium-, Natrium- und Kaliumsalze, vor allem aber Natrium- und Kaliumsalze bevorzugt

5 sind. Erdalkalisalze sind solche des Berylliums, Magnesiums, Calciums, Strontiums oder Bariums.

Bevorzugt sind Magnesium- und Calciumsalze, wobei Calciumsalze besonders bevorzugt sind. Als Ammoniumsalze können solche des unsubstituierten Ammoniumions,  $\text{NH}_4^+$ , Verwendung finden. Es ist aber auch möglich, solche Ammoniumsalze einzusetzen, bei denen das Ammoniumion durch 1 - 4 Alkyl-, Aryl- oder Aralkylreste substituiert ist. Für diese Reste gelten die zuvor gegebenen Definitionen, wobei als

10 Alkylrest Methyl, Ethyl und n-Propyl, als Arylrest die Phenylgruppe und als Aralkylrest die Benzylgruppe besonders bevorzugt sind.

Als Carboxamidorest wird der Rest  $\text{CONH}_2$  verstanden, aber auch solche Reste, bei denen die Aminogruppe durch ein oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxy-carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist.

15 In den erfindungsgemäß eingesetzten Pyrazoloderivaten der allgemeinen Formel I ist Z vorzugsweise so angeordnet, daß mindestens eine Doppelbindung der ungesättigten Kette in Konjugation zu der Doppelbindung oder zu dem N-Atom der allgemeinen Formel I steht.

Gegebenenfalls sind für eine Substanz der allgemeinen Formel I auch tautomere Formen möglich. Diese sollen ebenfalls als von der allgemeinen Formel I umfaßt gelten.

20 Die 3-Amino-pyrazoloderivate der allgemeinen Formel I können als freie Amine eingesetzt werden. Bevorzugt werden sie jedoch als entsprechende Ammoniumsalze verwendet. Hierfür sind Salze mit den verschiedensten Säuren möglich. Besonders bevorzugt sind solche Amine der allgemeinen Formel I, die mit einer Mineralsäure, wie Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Salpetersäure als Salz gebunden vorliegen. Hervorragend bewährt haben sich Hydrochloride der Substanzen der allgemeinen Formel I.

25 Erfindungsgemäß bevorzugt sind Substanzen der allgemeinen Formeln II bis XIII

30

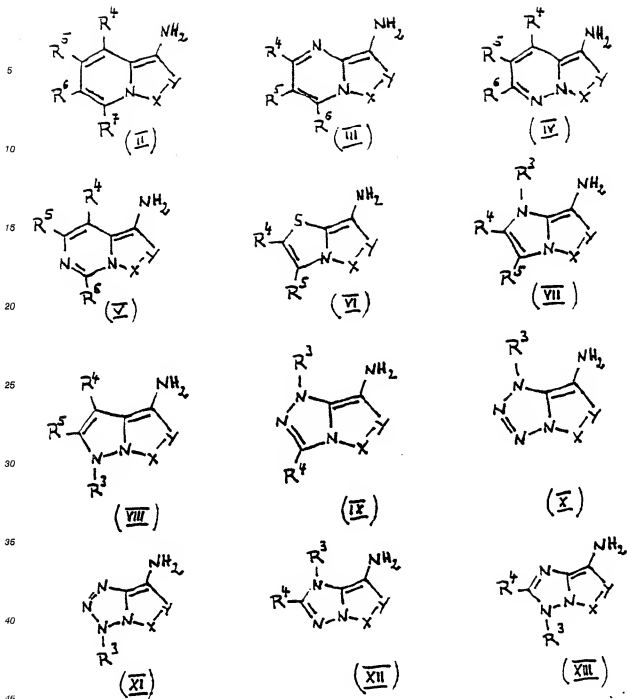
35

40

45

50

55



sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze.

Hierbei haben X-Y und R<sup>3</sup> die gleiche Bedeutung wie zuvor beschrieben. R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> und R<sup>7</sup>, die gleich oder verschieden sind, stehen für Wasserstoff, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Aralkyl, Aryl, Carboxy, Alkoxy-carbonyl, Carboxamido, Cyano, Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxy-carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist oder Halogen, wobei zwei benachbarte Reste gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist. Die Definitionen der Reste entsprechen den für die Substanzen der allgemeinen Formel I gegebenen.

Besonders bevorzugt für die ordnungsgemäße Verwendung sind Substanzen der allgemeinen Formeln II, III, IV, VI, VII und IX, gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze. Ganz besonders bevorzugt sind solche Substanzen, in denen X-Y die Bedeutung N=CR<sup>2</sup> hat, wobei R<sup>2</sup> die Bedeutung haben kann wie für die allgemeine Formel I angegeben.

Als hervorragend geeignet für die erfindungsgemäße Verwendung hat sich insbesondere die Verbindung 3-Amino-2-methyl-pyrazolo-[1.5a]-pyridin und deren Salze, insbesondere das Hydrochlorid erwiesen.

Einige Verbindungen der allgemeinen Formel I sind aus dem Stand der Technik als therapeutisch wirksame Substanzen bekannt.

- 5 So werden in DE-A-22 57 547 und J. Med. Chem. 17, 645 (1974) 3-Amino-5,7-dimethylpyrazolo[1.5-a]-pyrimidine als 3',5'-cyclo-AMP-Phosphodiesterase-Inhibitoren beschrieben.

In DE-A-30 19 019 werden Amino-pyrazolo[1.5-c]chinazolin-Derivate als Substanzen beschrieben, die schmerzstillende bzw. analgetische, die Magensäuresekretion hemmende und die Darmtätigkeit herabsetzende bzw. antiperistaltische Wirkungen zeigen.

- 10 In EP-A-0 299 209 werden 3-Aminopyrazolopyridine mit diuretischer, hypotensiver, vasodilatierender, cardiotonischer und die Blutplättchenaggregation inhibierender Wirkung genannt.

Aus Chemical Abstracts 89, 627, 43340r (1978) ist ein tetracyclisches 3-Aminopyrazolotriazinderivat bekannt.

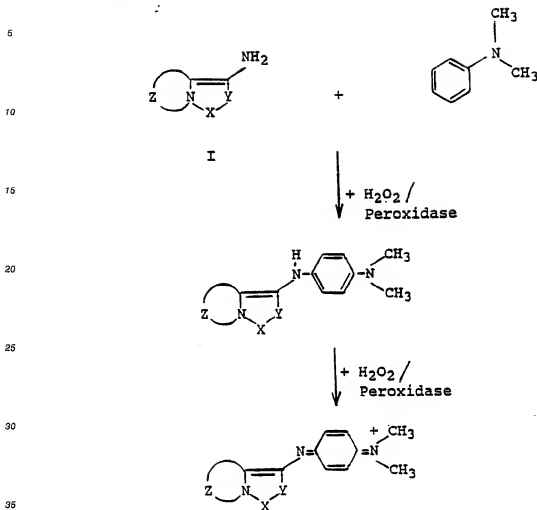
- Die Verwendung von Pyrazoloderivaten der allgemeinen Formel I als Komponente in oxidativen Kupplungsreaktionen zum kolorimetrischen Nachweis von Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxid bildenden Systemen, Peroxidase, peroxidatisch wirksamen Substanzen oder von elektronenreichen aromatischen Verbindungen ist in dem vorgenannten Stand der Technik nicht beschrieben.

- Zur erfindungsgemäßen Durchführung der kolorimetrischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxid bildenden Systemen, Peroxidase oder peroxidatisch wirksamer Substanzen mittels oxidativer Kupplung muß eine elektronenreiche aromatische Verbindung mit einem vorstehend beschriebenen Pyrazolderivat umgesetzt werden. Zur besseren Charakterisierung werden im folgenden die erfindungsgemäßen Pyrazoloderivate als Kupplungskomponente und die zur oxidativen Kupplung notwendigen elektronenreichen aromatischen Verbindungen als Kuppler bezeichnet.

- Als Kuppler, der mit einer erfindungsgemäßen Kupplungskomponente eine oxidative Kupplung einzugehen vermag, kommt prinzipiell jede Substanz in Frage, die auch mit p-Phenyldiamin als Kupplungskomponente eine solche Reaktion eingehen kann. Dies ist für den Fachmann einfach zu prüfen. Hierzu sind eine Reihe von Substanzen, beispielsweise aus der Farbfotographie bekannt. So sind die in T.H. James, "The theory of the photographic process", 3rd ed., McMillan, New York, 1966, chapter 17 ("Principles and Chemistry of Color Photography"), S. 382 - 396 genannten phenolischen Kuppler und Kuppler mit aktiven Methylengruppen geeignet, mit den erfindungsgemäßen Pyrazoloderivaten eine oxidative Kupplung einzugehen. Am gebräuchlichsten sind Phenol, Phenolderivate, Naphthol, Naphtholderivate, Naphthylamin, Naphthylaminderivate oder Anilinderivate.

- Bevorzugte Kuppler im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Anilinphosphonsäurederivate, wie sie in EP-A-0 175 250 beschrieben sind, N,N-Dimethylanilin, 2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzoesäure oder N-Ethyl-N-3-sulfo-2-hydroxypropyl-m-anisidin.

Die erfindungsgemäßen Nachweisreaktionen, die zur Bildung eines Farbstoffes führen, lassen sich wie folgt am Beispiel eines N,N-Dimethylanilins als Kuppler formulieren:

Schema 1:

Verallgemeinert lässt sich hieraus ersehen, daß zum Nachweis von Wasserstoffperoxid oder eines dieses liefernden Systems, ein Pyrazoloderivat der allgemeinen Formel I, ein Kuppler und Peroxidase oder eine peroxidatisch wirksame Substanz mit der zu untersuchenden Probe in Kontakt gebracht werden müssen. Unter Wasserstoffperoxid liefernden Systemen sind insbesondere die in der klinischen Diagnostik wichtigen Substrat/Substratoxidase-Paare zu verstehen, von denen stellvertretend einige der wichtigsten Vertreter bereits in der Einleitung vorgestellt wurden und bei denen das Substrat in Gegenwart von Luftsauerstoff oxidiert und Wasserstoffperoxid produziert wird. Es lassen sich somit entweder Substrat oder Substratoxidase nachweisen, je nachdem, welche Komponente bekannt ist und zusammen mit den übrigen Nachweisreagenzien mit der zu untersuchenden Probe kontaktiert wird.

Soll das Enzym Peroxidase oder eine peroxidatisch wirksame Substanz bestimmt werden, muß die Probe mit Kuppler, Pyrazoloderivat der allgemeinen Formel I und Wasserstoffperoxid zur Reaktion gebracht werden. Alternativ kann natürlich auch eine Substanz nachgewiesen werden, die als Kuppler, wie beispielsweise in Schema 1 N,N-Dimethylanilin, wirken kann. Es muß dann ein Pyrazoloderivat der allgemeinen Formel I und ein Oxidationsmittel, das nicht unbedingt das System Wasserstoffperoxid/Peroxidase sein muß, sondern auch ein anderes Oxidationsmittel sein kann, beispielsweise ein Peroxid, wie Persulfat oder Peracetat, oder Perjodat, Chloramin T oder insbesondere ein Cyanoferr-Komplex, beispielsweise Kaliumhexacyanoferrat (III) oder eine Oxidase gemäß DE-A-33 31 588, mit der Probe in Kontakt gebracht werden.

Die bei positivem Ergebnis auftretende Farbe kann bezüglich ihrer Intensität als Maß für die Menge der zu bestimmenden Substanz herangezogen werden. Sie kann visuell oder photometrisch ausgewertet werden.

Mit den zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur kolorimetrischen Bestimmung von



Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxid bildenden Systemen, Peroxidase, peroxidatisch wirksamen Substanzen oder elektronenreichen aromatischen Verbindungen erforderlichen Substanzen lassen sich erfindungsgemäße Mittel herstellen, die in einer Küvette gemessen werden können. Mittel zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxid bildenden Systemen, Peroxidase oder peroxidatisch wirksamen Substanzen enthalten erfindungsgemäß eine elektronenreiche aromatische Verbindung und als oxidativ hiermit kuppelbare heterocyclische Substanz ein Pyrazolodivat der allgemeinen Formel I. Separat oder zusammen mit diesen Substanzen können weitere für den jeweiligen Parameternachweis notwendige Stoffe, wie Peroxidase zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid; Peroxidase und Enzymsubstrat zur Bestimmung des das Substrat unter Bildung von Wasserstoffperoxid oxidierenden Enzyms; Peroxidase und oxidierenden Enzym zur Bestimmung des durch das Enzym unter Bildung von Wasserstoffperoxid oxidierbaren Enzymsubstrats; oder Wasserstoffperoxid zur Bestimmung von Peroxidase oder peroxidatisch wirksamen Substanzen vorliegen. Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung einer elektronenreichen aromatischen Verbindung enthalten ein Oxidationsmittel und ein Pyrazolodivat der allgemeinen Formel I.

Weitere Bestandteile der erfindungsgemäßen Mittel können Puffer sowie gegebenenfalls Netzmittel, Aktivatoren und andere Hilfsstoffe sein.

Die Reagenzbestandteile können zusammen, getrennt oder je nach Verträglichkeit und Zweckmäßigkeit miteinander kombiniert als Pulver, zu Tabletten verpreßt oder vorzugsweise in Wasser oder Puffer gelöst und gegebenenfalls anschließend eingetrocknet oder lyophilisiert zu dem erfindungsgemäßen Mittel verarbeitet sein.

Eine so gewonnene feste Reagenzmischung wird vor Gebrauch in Wasser oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel gelöst und so die Reagenzlösung bereitet. Nach Vermischen der Probe (beispielsweise Substratlösung, Enzymlösung, Serum oder Plasma) mit einem aliquoten Teil der Reagenzmischung wird die entstehende Farbe an einem Photometer gemessen und über den molaren Extinktionskoeffizienten und die zugesetzten Reagenz- bzw. Probevolumina die jeweilige Konzentration bzw. Substratkonzentration berechnet. Es sind sowohl kinetische als auch Endpunktmessungen möglich.

Erfindungsgemäße Mittel können die erfindungsgemäß verwendbaren Pyrazoloderivate zusammen mit den übrigen für den jeweiligen Parameternachweis notwendigen Substanzen, wie Oxidationsmittel, Enzyme, elektronenreiche aromatische Substanz oder/und Enzymsubstrat, Puffer, gegebenenfalls Netzmittel und Aktivatoren sowie andere Hilfsstoffe auch in oder auf quellfähigen oder saugfähigen Reagenzträgern, wie Polymerfilmen, Papieren, Membranen, Vliesen etc. enthalten. Dazu kann man je nach Verträglichkeit bzw. Zweckmäßigkeit eine oder mehrere Lösungen in Form von wässrigen oder organischen bzw. gemischten Lösungen herstellen, je nachdem wie sich die Reagenzien oder Hilfsstoffe lösen. Mit diesen Lösungen werden saugfähige Glas- oder Kunststoffvliese, imprägniert oder besprüht. Anschließend wird getrocknet. Die so hergestellten Reagenzträger können entweder als Schnelldiagnostika zur direkten Bestimmung von Inhaltsstoffen von Flüssigkeiten (z.B. in Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin oder Speichel, oder in Lebensmitteln z.B. Fruchtsäften, Milch o.a.) eingesetzt werden. Die Flüssigkeit wird dabei direkt auf den Reagenzträger gebracht oder dieser kurz in die Flüssigkeit eingetaucht. Eine semiquantitative Bestimmung ist möglich, indem man die so entstandene Farbe einer Vergleichsfarbe zuordnet. Eine quantitative Auswertung läßt sich remissionsphotometrisch durchführen. Durch Eluieren der vorweggenannten Reagenzien mit Wasser bzw. Puffer oder Serum aus dem saugfähigen Träger läßt sich eine Reagenzlösung herstellen, mit der man wie oben beschrieben, Substrate oder Enzyme in einer Küvette am Photometer bestimmen kann. Die quantitative Bestimmung durch remissionsphotometrische Auswertung läßt sich besonders gut durchführen, wenn ein erfindungsgemäß verwendbares Pyrazolodivat gemeinsam mit den restlichen notwendigen Reagenzien und Hilfsstoffen und einem filmbildenden Kunststoff, z.B. gemäß DE-C-1598153, zu einem Reagenzfilm verarbeitet wird. Die glatte Oberfläche eines solchen Films ergibt dabei weniger Störungen der Remission und eine homogenere Färbung als die üblicherweise verwendeten saugfähigen Papiere.

Puffer im Sinne dieser Erfindung haben einen pH-Wert von 5-10, insbesondere 6,5 - 8 Phosphat-, Citrat-, Borat-, GOOD-Puffer mit Alkali- oder Ammoniumgegenionen werden am häufigsten verwendet, andere Systeme sind jedoch ebenfalls brauchbar.

Netzmittel sind insbesondere anionische und kationische Netzmittel. Nichtionogene Netzmittel, die Enzyme aktivieren, sind jedoch ebenfalls brauchbar. Natriumlaurylsulfat, Dioctylnatriumsulfosuccinat und Alkylarylpolyetheralkohole werden bevorzugt.

Als Aktivatoren sind bei der Bestimmung eines Enzyms oder Enzymsubstrats als Beispiel eines Wasserstoffperoxid bildenden Systems die für die jeweilige Enzymreaktion bekannten einzusetzen. Oft ist die farbbildende Reaktion so schnell, daß eine zusätzliche Aktivierung nicht notwendig erscheint.

Als sonstige Hilfsstoffe können übliche Verdicker, Emulgatoren, optische Aufheller, Kontrastmittel etc. sinnvoll sein, wie sie in entsprechenden Testen mit anderen Chromogenen bekannt sind.

Die Kupplungsreaktion erfolgt üblicherweise bei Raumtemperatur, kann jedoch auch ohne weiteres bei

höherer Temperatur, beispielsweise bei 37°C, durchgeführt werden, wenn dies für die Reaktionsgeschwindigkeit beispielsweise einer vorgeschalteten enzymatischen Reaktion sinnvoll ist.

Für die üblicherweise vorkommenden Reaktionen mit Substraten bzw. Substrat oxidierenden Enzymen haben sich folgende Konzentrationen der Testlösung bewährt:

5

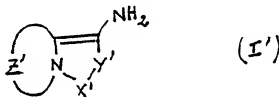
Pyrazoloderivat	0,05 - 50 mmol/l vorzugsweise 0,1 - 1 mmol/l
10	
Kuppler	0,05 - 100 mmol/l
15	
Puffer pH 5 -10	0,05 - 1 Mol/l
vorzugsweise pH 6,5 - 8	vorzugsweise 0,1 - 0,5 Mol/l
Netzmittel	0 - 1,0 Mol/l
20	
	vorzugsweise 0,05 - 0,1 Mol/l
25	
a) Peroxidase	1,0 - 5000 KU/l
b) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bzw. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -produzierendes Substrat/Enzymgemisch	
0,1 - 10 mMol/l	
30	
sonstige Hilfsstoffe	0 - 5 Mol/l

Die vorstehenden Konzentrationsbereiche sind so zu verstehen, daß die unteren Bereiche jeweils für die photometrischen Tests in der Küvette und die oberen Bereiche für Schnelltests bzw. Tests auf festen Trägern bevorzugt sind.

Die erfindungsgemäß verwendbaren Pyrazoloderivate zeigen viele Vorteile. So ermöglichen sie aufgrund quantitativer oder nahezu quantitativer Reaktion mit entsprechenden Kupplern eine sehr hohe Farbausbeute. Die durch die oxidative Kupplung erzeugten Farbstoffe, insbesondere diejenigen, die mit Anilinderivaten gemäß EP-A-0 175 250 als Kuppler entstehen, sind stabil und weisen eine hohe Extinktion auf. Außerdem liegt das Absorptionsmaximum ( $\lambda_{max}$ ) der Farbstoffe so hoch, daß auch hämolyisiertes Plasma oder Serum als Probenmaterial verwendet werden kann. Die erfindungsgemäß verwendbaren Pyrazoloderivate zeichnen sich außerdem durch eine schnelle Farbbildung mit einem Kuppler unter oxidativen Kupplungsbedingungen aus. Darüber hinaus zeigen die erfindungsgemäß verwendbaren Pyrazoloderivate eine geringe Autoxidationsneigung, so daß sie die für einen kommerziellen Test notwendige Lagerstabilität aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die nicht aus dem Stand der Technik bekannten und damit neuen Pyrazoloderivate der allgemeinen Formel I'

45



50

in der

55 X'-Y'

NR<sup>1</sup>'-CO oder N=CR<sup>2</sup>' bedeutet,

wobei R<sup>1</sup>' Alkyl und

R<sup>2</sup>' Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkylthio, Aryl, Aralkyl, gegebenenfalls jeweils substituiert durch Hydroxy, Dialkylphosphinyl, Carboxy, SO<sub>3</sub>H, PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, ein Salz eines dieser Säurereste oder/

Alkoxy-carbonyl;

Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxy-carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist wobei, wenn Amino durch 2 Alkylreste substituiert ist, diese Reste auch zu einem Ring geschlossen sein können, der außer durch das N-Atom der Aminogruppe gegebenenfalls auch durch Sauerstoff, Schwefel oder ein weiteres Stickstoffatom unterbrochen sein kann oder Amino gegebenenfalls durch ein oder zwei Acylgruppen, Alkoxy- oder/und Alkoxy-carbonylgruppen, H<sub>2</sub>N-CO, Alkyl-, Arylalkyl- oder/und Arylcarbamoylgruppen substituiert ist; oder Wasserstoff, Carboxy, Alkoxy-carbonyl, Carboxamido oder Halogen ist, und

$\text{NR}^3\text{-H} = \text{N}$  bedeutet,

wobei R<sup>3</sup> Alkyl oder Aryl ist oder

Z' eine ungesättigte Kette mit 3 bis 5 Gliedern aus Stickstoffatomen oder aus Kohlenstoffatomen und gegebenenfalls einem oder mehreren Stickstoff- oder Schwefelatomen darstellt, wobei sämtliche Kohlenstoffatome der ungesättigten Kette Teil einer Doppelbindung sind und wobei Kohlenstoffatome gegebenenfalls substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Arylalkyl, Aryl, Carboxy, Carboxamido, Alkoxy-carbonyl, Cyano, Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxy-carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist oder Halogen und wobei Stickstoffatome, die nicht über eine Doppelbindung gebunden sind durch Alkyl oder Arylalkyl substituiert sind oder zwei benachbarte Kettensubstituenten gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist, oder gegebenenfalls entsprechende Tautomere und deren Salze

unter der Bedingung, daß,

a) wenn X'-Y' gleich N = CR<sup>2'</sup> mit R<sup>2'</sup> gleich Alkyl oder Phenyl und

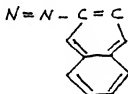
Z' eine ungesättigte Kette aus 4 Kohlenstoffatomen ist, diese nicht unsubstituiert und nicht durch Alkyl, Alkoxy oder Halogen substituiert ist,

b) wenn Z' eine ungesättigte Kette aus vier Gliedern mit 3 Kohlenstoffatomen und einem Stickstoffatom am Ende der Kette bedeutet, so daß in Formel I' der Ring mit Z' einen Pyrimidinring bildet und ein oder mehrere Kohlenstoffatome substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Aryl, Alkoxy-carbonyl oder Halogen und

X'-Y' für N = CR<sup>2'</sup> steht,

R<sup>2'</sup> nicht Wasserstoff bedeutet,

c) wenn Z'



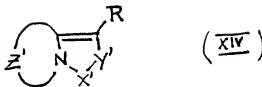
bedeutet, so daß in Formel I' der Ring mit Z' einen 1,2,4-Triazinring bildet und

X'-Y' für N = CR<sup>2'</sup> steht,

R<sup>2'</sup> nicht Methyl ist.

Die Bedeutung der einzelnen Reste entspricht der für die allgemeine Formel I angegebenen. Ebenso gelten für die neuen Pyrazoloderivate die gleichen Ausführungen wie sie für die erfindungsgemäß verwendbaren Pyrazoloderivate bezüglich vorteilhafter Reste und Gruppen gemacht sind.

Außerdem ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Pyrazoloderivaten der allgemeinen Formel I, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine Verbindung der allgemeinen Formel XIV



in der

10  $X'-Y'$  und  $Z'$  die gleiche Bedeutung wie für die allgemeine Formel I' haben und

R Wasserstoff ist,

a) durch Umsetzung mit Salpetersäure oder Salpetersäure im Gemisch mit Schwefelsäure und/oder Acetanhydrid in eine Verbindung der allgemeinen Formel XIV mit R gleich Nitro oder

15 b) durch Reaktion mit salpetriger Säure in eine Verbindung der allgemeinen Formel XIV mit R gleich Nitroso oder

c) durch Reaktion mit einem aromatischen Diazoniumsalz in eine Verbindung der allgemeinen Formel XIV mit R gleich Arylazo

überführt und anschließend reduziert wird.

Die Synthese der Verbindungen der allgemeinen Formel I' kann nach an sich bekannten Methoden 20 erfolgen, indem man eine Verbindung der allgemeinen Struktur XIV nach an sich bekannten Methoden in die Aminoverbindung überführt.

Nitro-, Nitroso- und Arylazoreste, das sind Reste  $Aryl-N=N-$ , wobei Aryl die gleiche Bedeutung haben kann, wie zuvor für Arylreste und andere solche Reste enthaltende Gruppen erläutert, lassen sich durch Reduktion mit Reagentien, wie Zink in Säure, beispielsweise Salzsäure oder Eisessig, Natriumdithionit, Zinn 25 in Säure, beispielsweise Salzsäure, Zinn(II)-chlorid oder durch katalytische Hydrierung beispielsweise über Palladium/Kohle in die Aminoverbindung überführen. Solche Reaktionen sind in Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Bd. 11/1, S. 341 f beschrieben.

Die Einführung von Nitro-, Nitroso oder Arylazogruppen ausgehend von Verbindungen der Formel XIV mit R = H kann durch Nitrierung mit Salpetersäure oder Salpetersäure in Gemischen mit konzentrierter 30 Schwefelsäure oder Acetanhydrid erfolgen. Durch Nitrosierung mit salpetriger Säure oder durch Azokuppelung mit aromatischen Diazoniumsalzen, lassen sich die Nitrosogruppe bzw. eine Arylazogruppe einführen. Beispiele für solche Reaktionen sind in Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie Bd. 10/1 und 10/3 beschrieben.

In einigen Fällen ist auch die direkte Nitrosierung von Verbindungen der Formel XIV möglich, in der R 35 für Alkoxy-carbonyl, beispielsweise Acetyl steht, ohne durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure zuvor eine Hydrolyse zu einer Verbindung der Struktur XIV mit R = H durchführen zu müssen (vgl. Chem. Pharm. Bull. 22, 482 (1974)).

Liegen Heterocyclen der allgemeinen Formel XIV mit R gleich Carboxyl, Alkoxy-carbonyl oder Alkylcar- 40 bonyl vor, so können diese durch Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure und - bei Carbonsäuren - thermischer Decarboxylierung in die Verbindungen der allgemeinen Formel XIV mit R = H überführt werden. Daran schließt sich dann die Einführung einer Nitro-, Nitroso- oder Arylazogruppe an.

Stickstoffatome, die nicht an einer Doppelbindung stehen, und in den Resten  $X'-Y'$  oder  $Z'$  der allgemeinen Struktur I' vorkommen, müssen alkyliert oder aralkyliert sein. Die N-Alkylierung bzw. N- 45 Aralkylierung läßt sich durch Umsetzung der entsprechenden Verbindungen der Struktur XIV in der R die oben gegebene Bedeutung hat, mit Alkylierungs- bzw. Aralkylierungsmitteln, wie Alkyl- oder Aralkylhalogeniden, Dialkyl- bzw. Diaralkylsulfaten oder Arylsulfonsäurealkylestern bzw. -aralkylestern in Gegenwart einer Base, wie Natriumhydrid, tertiären Aminen, Alkalicarbonaten oder Natriumhydroxid in Lösungsmitteln, wie Dimethylformamid oder wässrig-alkoholische Systeme durchführen.

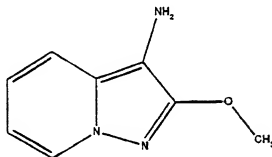
Die benötigten Ausgangsprodukte sind beschrieben oder lassen sich analog zu bekannten Verbindun- 50 gen synthetisieren. Informationen über die Herstellung der heterocyclischen Systeme sind in folgenden Publikationen enthalten: G.P. Ellis "Synthesis of fused Heterocycles", in "The Chemistry of Heterocyclic Compounds", E.G. Taylor Eds., 1987, John Wiley and Sons; P.N. Preston, "Condensed Imidazoles" in "The Chemistry of Heterocyclic Compounds", A. Weissberger und E.G. Taylor Eds., 1986, John Wiley and Sons; Adv. of Het. Chem. 36, 343 (1984); Chem. Pharm. Bull. 22, 482 (1974); J. Het. Chem. 12, 481 (1975); Chem. 55 Pharm. Bull. 22, 1814 (1974); Ann. 660, 104 (1962); Chem. Pharm. Bull. 23, 452 (1975); J. Het. Chem. 10, 413 (1973); J. Chem. Soc. Perkin I 2047 (1977).

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I' sind Basen, die mit organischen oder anorganischen Säuren Salze bilden, die sich vorteilhaft für die Isolierung und Reinigung verwenden lassen.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern, ohne daß die Erfindung als darauf beschränkt verstanden werden soll.

### Beispiel 1

#### 3-Amino-2-methoxy-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin-hydrochlorid



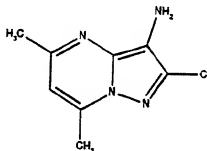
1.1 1,48 g 2-Methoxy-pyrazolo[1,5-a]-pyridin (Bull. Chem. Soc. Jap. 49, 1980 (1976)) werden unter Eiskühlung in 20 ml konzentrierter Salpetersäure gelöst und tropfenweise mit 10,5 ml rauchender Salpetersäure versetzt. Man rührt das Gemisch 30 Minuten im Eisbad und 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wird auf Eis gegossen, der ausgefallene Niederschlag abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Man erhält 1 g (52 % der Theorie) 2-Methoxy-3-nitro-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin (Fp 213-216 °C.)

1.2 0,8 g der in 1.1 erhaltenen Nitroverbindung werden in 80 ml 2 N Salzsäure suspendiert und unter heftigem Rühren mit Zinkstaub versetzt. Nach mehrmaliger Zugabe von Zinkstaub erhält man nach ca. 1 Stunde eine klare Lösung über einem Bodensatz von überschüssigem Zink. Dieser wird abfiltriert und das Filtrat mit Natriumhydroxid auf pH 7 gestellt. Die Mischung wird mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wird eingedampft und das verbleibende Öl mit Ethanol über eine kurze Schicht Kieselgel filtriert. Das Eluat wird eingedampft, der Rückstand in Ether gelöst und mit etherischer Salzsäure versetzt. Der ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt und nochmals aus Isopropanol umkristallisiert. Man erhält 0,33 g (42 % der Theorie) der Titelverbindung mit Fp. 238-241 °C.

DC (Kieselgel, Aceton/Methylenchlorid/Eisessig 50:45:5):  $R_F = 0,6$ .

### Beispiel 2

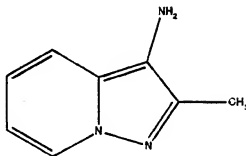
#### 3-Amino-2-chlor-5,7-dimethyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidinhydrochlorid



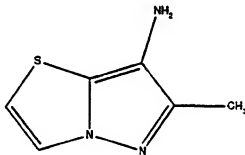
Analog Beispiel 1 erhält man ausgehend von 2-Chlor-5,7-dimethylpyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin (Ann. Chem. 647, 116 (1961)) 3-Amino-2-chlor-5,7-dimethyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin-hydrochlorid mit Fp. 227-230 °C.

DC (Kieselgel, Aceton/Metylenchlorid/Eisessig 50:45:5):  $R_F = 0,8$

### Beispiel 3

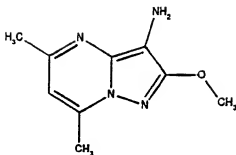
3-Amino-2-methyl-pyrazolo-[1.5-a]-pyridin-hydrochlorid

7 g 3-Acetyl-2-methyl-pyrazolo-[1.5-a]-pyridin (J. Org. Chem. 42, 443 (1977)) werden in 140 ml 6 N Salzsäure gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit einer Lösung von 5,52 g Natriumnitrit in Wasser versetzt. Nach 2 Stunden wird das Eisbad entfernt und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen und dann auf pH 9 gestellt. Die ausgefallene Nitrosoverbindung (6.4 g) wird abgesaugt und in ca. 150 ml 2 N Salzsäure gelöst. Analog Beispiel 1.2 wird die Nitrosoverbindung mit Zinkstaub reduziert. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit Essigsäureethylester chromatographiert. Die Produktfraktionen werden eingeengt, in Ethanol gelöst und mit ethanolischer Chlorwasserstoffsäure versetzt. Der nach einiger Zeit ausfallende Niederschlag wird abgesaugt und getrocknet. Man erhält 3.1 g (45 % der Theorie) der Titelverbindung mit Fp. > 275 °C, DC (Kieselgel, Essigsäureethylester/Aceton/Eisessig/Wasser 50:25:12,5:12,5): Rf = 0.6

Beispiel 43-Amino-2-methyl-pyrazolo-[3.2-b]-thiazol-hydrochlorid

Analog Beispiel 3 erhält man aus 3-Acetyl-2-methyl-pyrazolo-[3.2-b]-thiazol (Chem. Pharm. Bull. 22, 482 (1974)) 3-Amino-2-methyl-pyrazolo-[3.2-b]-thiazol-hydrochlorid mit Fp 215-218 °C, DC (Kieselgel, Methanol): Rf = 0,65

Beispiel 53-Amino-2-methoxy-5,7-dimethyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin-hydrochlorid



1,04 g 2-Methoxy-5,7-dimethyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin (Ann. Chem. 647, 116 (1961)) werden analog Beispiel 3 nitrosiert. Man erhält 1,1 g (91 % der Theorie) der entsprechenden 3-Nitrosoverbindung die analog Beispiel 1,2 mit Zinkstaub reduziert wird. Man erhält 0,8 g (80 % der Theorie) der Titelverbindung mit Fp. 187-190 °C.

DC (Kieselgel, Aceton/Methylenchlorid/Eisessig 50:45:5): Rf = 0,6

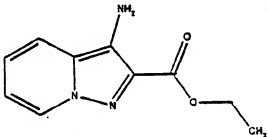
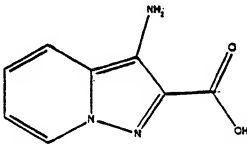
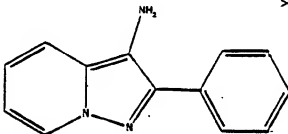
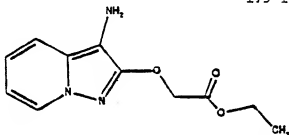
#### Beispiel 6

Analog Beispiel 5 erhält man die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Verbindungen durch Nitrosieren des 3-H-Ausgangsheterocyclus und Reduktion der Nitrosogruppe.

Der Ausgangsheterocyclus von Beispiel 6 b) ist beschrieben in J. Het. Chem. 12, 481 (1975), von Beispielen 6 c) und 6 d) in J. Het. Chem. 18, 1149 (1981). Der 3-H-Ausgangsheterocyclus des Beispiels 6 a) wird analog der entsprechenden 2-Methoxyverbindung in Beispiel 1 durch Alkylierung mit Bromessigsäurethylester (analog Bull. Chem. Soc. Jap. 49, 1980 (1976) hergestellt.

Tabelle

Beispiel Nr.	Struktur	Fp.	R <sub>f</sub> 1)
6 a		179-184 °C	0,752)
6 b		>240 °C	0,753)
6 c		>250 °C	0,354)
6 d		205-213 °C	0,6 5)



1) DC an Kieselgel

2) Laufmittel: Aceton/Methylenchlorid/Eisessig 50:45:5

3) Laufmittel: Methanol

4) Laufmittel: Essigsäureethylester/Aceton/Eisessig/  
Wasser 50:25:12,5:12,5

5) Laufmittel: Essigsäureethylester

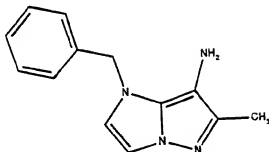


## Beispiel 7

5 3-Amino-4-benzyl-pyrazolo-[1.5-a]-imidazol-dihydrochlorid

10

15



20

0,4 g 4-Benzyl-3-nitroso-pyrazolo-[1.5-a]-imidazol (Chem. Pharm. Bull. 22, 482 (1974)) werden analog Beispiel 1.2 mit Zink in Salzsäure reduziert und mit äthanolischer Chlorwasserstoffsäure in das Dihydrochlorid überführt. Man erhält 0,37 g (85 % der Theorie) 3-Amino-4-benzyl-pyrazolo-[1.5-a]-imidazol-dihydrochlorid mit Fp. 158 °C (Zersetzung).

25

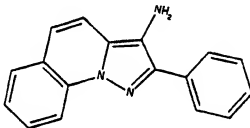
DC (Kieselgel, Aceton/Methylenchlorid/Eisessig 50:45:5): Rf = 0,4

## Beispiel 8

30 3-Amino-2-phenyl-pyrazolo-[1.5-a]-chinolin

35

40



45

1,0 g 2-Phenyl-pyrazolo-[1.5-a] chinolin (J. Het. Chem. 12, 481 (1975)) werden analog Beispiel 3 nitrosiert. Man erhält 1 g (89 % der Theorie) der entsprechenden 3-Nitrosoverbindung, die in 90 ml Ethanol suspendiert und mit 200mg Palladium auf Kohle versetzt wird. Die Mischung wird auf 80 °C erhitzt und 0,25 ml Hydrazin-Hydrat werden portionsweise zugegeben. Nach 10 Minuten wird die Palladium-Kohle abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird in Ethanol gelöst und mit äthanolischer Chlorwasserstoffsäure versetzt. Das ausgefallene Hydrochlorid wird abgesaugt. Man erhält 0,7 g (72 % der Theorie) der Titelverbindung mit Fp. 255-258 °C.

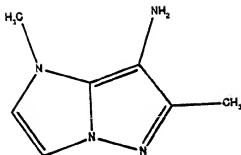
50

DC (Kieselgel, Methylenchlorid): Rf = 0,2

## Beispiel 9

55 3-Amino-2,4-dimethyl-pyrazolo-[1.5-a]-imidazol-dihydrochlorid

60



9.1 1,92 g 1,2-Dimethylimidazol werden in 10 ml Methylenchlorid gelöst und unter Eiskühlung mit einer Lösung von O-p-Toluolsulfonyl-hydroxylamin versetzt, die durch Umsetzung von 15,4 g O-p-Toluolsulfonyl-acetoxamsäureethylester mit 118 ml 60 %iger wässriger Perchlorsäure erhalten wurde. Das Gemisch wird 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert und mit Ether gewaschen. Man erhält 5 g (88 % der Theorie) N-Amino-1,2-dimethylimidazolium-p-toluolsulfonat.

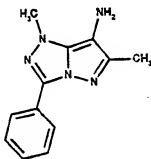
9.2 5 g des in 9.1 erhaltenen Produktes werden mit 5.4 g Natriumacetat und 125 ml Acetanhydrid 1 Stunde auf 140 °C (Badtemperatur) erhitzt. Die Reaktionsmischung wird im Vakuum eingedampft und in Wasser aufgenommen. Man stellt den pH-Wert auf ca. 9-10 und extrahiert mit Methylenchlorid. Die organische Phase wird getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird an Kieselgel mit Essigsäureethylester chromatographiert. Man erhält 0.45 g (11 % der Theorie) 3-Acetyl-2,4-dimethyl-pyrazolo-[1.5-a]-imidazol mit Fp 165 -167 °C.

9.3 Die in 9.2 erhaltene Verbindung wird analog Beispiel 3 nitrosiert. Man erhält 0,35 g (94 % der Theorie) der entsprechenden 3-Nitrosoverbindung mit Fp. 179-183 °C, die in 100 ml verdünnter wässriger Natriumbicarbonatlösung gelöst wird und mit Natriumdithionit reduziert wird. Die Reaktionsmischung wird eingedampft und mit Ethanol digeriert. Die Ethanollösung wird eingeeengt und das Produkt durch Zugabe von etherischer Chlorwasserstoffsäure ausgefällt. Man erhält 0,3 g (80 % der Theorie) der Titelverbindung mit Fp. 199-204 °C (Zers.).

DC (Kieselgel, Essigsäureethylester/Aceton/Eisessig/ Wasser = 50:25:12,5:12,5): Rf = 0,2

Beispiel 10

3-Amino-2,4-dimethyl-6-phenyl-pyrazolo-[3.2-c]-s-triazolhydrochlorid



10.1 0,84 g 2-Methyl-6-phenyl-pyrazolo-[3.2-c]-s-triazol (J. Chem. Soc. Parkin I, 2047 (1977)) werden in 15 ml Dimethylformamid gelöst und mit 0,95 g p-Toluolsulfonsäuremethylester versetzt. Zu dieser Mischung gibt man portionsweise 0,2 g 55 %iges Natriumhydrid und rührt 1 Stunde bei Raumtemperatur. Das Reaktionsgemisch wird auf Eis gegossen und die Mischung mit Essigsäureethylester extrahiert. Man erhält 1 g rohes 2,4-Dimethyl-6-phenyl-pyrazolo-[3.2-c]-s-triazol. DC (Kieselgel, Methylenchlorid/Essigsäureethylester 50:1) Rf = 0,5.

10.2 Zu einer Lösung von 1,8 g 2,4-Dimethyl-6-phenyl-pyrazolo-[3.2-c]-s-triazol und 0,5 g Natriumacetat in 8 ml Eisessig gibt man portionsweise Phenyl diazoniumtetrafluorborat, das durch Diazotierung von 2,2 ml Anilin erhalten wurde. Man läßt das Gemisch über Nacht stehen, verdünnt mit Wasser und saugt den orangefarbenen Niederschlag ab. Die 3-Phenylazoverbindung wird durch Chromatographie an Kieselgel mit

Methylenchlorid gereinigt.

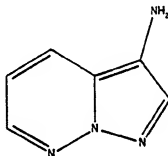
Ausbeute 1,3 g (73 % der Theorie) mit Fp. 183-186 °C.

10.3 1,3 g 2,4-Dimethyl-6-phenyl-3-(phenyl-azo-pyrazolo-[3,2-c]-s-triazol aus 10.2 werden in einem Gemisch aus 100 ml Ethanol und 100 ml verdünnter wässriger Natriumbicarbonatlösung suspendiert und mit überschüssigem Natriumdisulfid versetzt. Die Mischung wird ca. 2 Tage bei 60 °C gerührt. Während dieser Zeit gibt man noch Natriumdisulfid, Natriumbicarbonat und Ethanol (1 ltr) zu. Die Reaktionsmischung wird eingedampft und der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen. Die organische Phase wird gründlich mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird in Ethanol gelöst und durch Zugabe von ethanolischer Chlorwasserstoffsäure das Hydrochlorid ausgefällt. Man erhält 0,8 g der Titelverbindung mit Fp. 210-213 °C.

DC (Kieselgel, Essigsäureethylester/Aceton/Eisessig/ Wasser 50:25:12,5:12,5): Rf = 0,7

#### Beispiel 11

##### 3-Amino-pyrazolo-[1.5-b]-pyridazin-hydrochlorid



11.1 1,8 g Pyrazolo-[1.5-b]-pyridazin-3-carbonsäureethylester (Chem. Pharm. Bull. 32, 1814 (1974)) werden mit 36 ml 6N Salzsäure 5 Stunden unter Rückfluß gekocht. Die Reaktionsmischung wird eingedampft und der Rückstand in Wasser gelöst. Man neutralisiert mit Natriumbicarbonat und extrahiert 3 mal mit Essigsäureethylester. Die organische Phase wird getrocknet und eingedampft. Man erhält 0,85 g (75 % der Theorie) öliges Pyrazolo-[1.5-b]-pyridazin.

DC (Kieselgel, Methylenchlorid/Essigsäureethylester 2:1): Rf = 0,6.

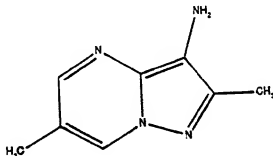
11.2 0,8 g der in 11.1 erhaltenen Verbindung werden analog Beispiel 8 nitrosiert. Man erhält 0,6 g (60 % der Theorie) 3-Nitroso-pyrazolo-[1.5-b]-pyridazin mit Fp. 129-132 °C.

Analog Beispiel 8 wird die Nitroso-Verbindung mit Palladium/Hydrazin reduziert. Man erhält 0,4 g (58 % der Theorie) der Titelverbindung mit Fp. 230 °C (Zers.).

DC (Kieselgel, Essigsäureethylester/Methanol 1:1): Rf = 0,6

#### Beispiel 12

##### 3-Amino-2,6-dimethyl-pyrazolo-[1.5-a]-pyrimidin-hydrochlorid

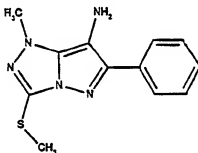


3,2 g 2,6-Dimethyl-3-nitro-pyrazolo-[1.5-a]-pyrimidin (Synthesis 673 (1982)) werden in 320 ml Ethanol

gelöst und mit 320 ml 5 %iger Natriumbicarbonatlösung in Wasser versetzt. Zu diesem Gemisch gibt man unter Rühren und Kühlen portionsweise 14,2 g Natriumdithionit zu, bis das Dünnschichtchromatogramm die Abwesenheit von Ausgangsmaterial zeigt. Man engt das Reaktionsgemisch etwas ein und extrahiert 3 x mit Essigsäureethylester. Die organische Phase wird getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Ethanol gelöst und mit einer äquimolaren Menge Chlorwasserstoff in Ether versetzt. Die ausgefallenen Kristalle werden abgesaugt. Man erhält 2,9 g (80 % der Theorie) der Titelverbindung mit Fp. 224 °C (Zersetzung). DC (Kieselgel, Chloroform/Methanol/Methylethylketon/Eisessig/Wasser (75:35:25:5:8): Rf = 0,73.

#### 10 Beispiel 13

##### 3-Amino-4-methyl-6-methylthio-2-phenyl-pyrazolo-[3,2-c]-s-triazol-hydrochlorid



13.1 4,8 g 6-Methylthio-2-phenyl-pyrazolo(3,2-c)-s-triazol (J. Chem. Soc. Perkin I, 2047 (1977)) werden in 48 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 4,4 g p-Toluolsulfonsäure-methylester versetzt. Dazu gibt man portionsweise unter Rühren 1 g ca. 55 %iges Natriumhydrid. Die Mischung wird 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und dann auf Eis/Wasser gegossen. Man extrahiert mit Essigsäureethylester, trocknet die organische Phase und dampft zur Trockene ein. Das Rohprodukt wird durch Chromatographie an Kieselgel mit Methylenchlorid/Essigsäureethylester (50:1) gereinigt. Man erhält 1,5 g (30 % der Theorie) des an N-4 methylierten Heterocyclus.

DC (Kieselgel, Methylenchlorid/Essigsäureethylester 50:1): Rf = 0,35.

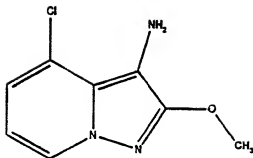
13.2 1,2 g der in 13.1 erhaltenen Verbindung werden in 36 ml Eisessig gelöst und mit 1,33 g 4-Methoxyphenyldiazonium-tetrafluorborat versetzt. Nach 2 Stunden gibt man nochmals die gleiche Menge des Diazoniumsalzes zu und rührt das Gemisch über Nacht. Das Reaktionsgemisch wird mit Wasser verdünnt und der pH mit verdünnter wässriger Natronlauge auf 5 gestellt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und bei 50 °C im Vakuum getrocknet. Man erhält 1,9 g (100 % der Theorie) der entsprechenden 3-Azoverbindung.

13.3 Die in 13.2 erhaltene Azoverbindung wird in 100 ml Eisessig suspendiert und durch Zugabe von Zinkstaub reduziert. Das überschüssige Zink wird abfiltriert und die Reaktionsmischung eingedampft. Zur Reinigung wird das Rohprodukt in 100 ml Dioxan gelöst und mit 1,5 g Di-tert.-Butyldicarbonat versetzt. Man rührt das Gemisch 2 Stunden, dampft ein und chromatographiert das Produkt an Kieselgel mit Methylenchlorid/Essigsäureethylester (100:0 bis 90:10). Die Fraktionen, die die gewünschte N-tert.-butoxycarbonylierte Aminoverbindung enthält, werden vereinigt, eingedampft und in 50 ml Ethanol suspendiert. Man gibt zur Abspaltung der t-Butoxycarbonylgruppe 50 ml ethanolische Chlorwasserstoffsäure zu und rührt bei Raumtemperatur. Das Gemisch wird zur Trockene eingedampft, in Ethanol heiß gelöst, filtriert und das Filtrat mit Ether versetzt. Der Niederschlag wird abgesaugt. Man erhält 0,6 g (40 % der Theorie) der Titelverbindung mit Fp. 207-210 °C.

DC (Kieselgel, Essigsäureethylester): Rf = 0,85

#### Beispiel 14

##### 3-Amino-4-chlor-2-methoxy-pyrazolo-[1,5-a]-pyridinhydrochlorid



7,5 g N-Amino-3-chlorpyridinium-mesitylsulfonat (J. Chem. Soc. Perkin I, 2580 (1973)) werden in 50 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 3,5 g fein gepulvertem Kaliumcarbonat versetzt. Unter Kühlung gibt man 28 ml einer 5 m Diketenlösung in Methylenchlorid zu. Die Mischung wird 30 Minuten bei 0 °C und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt, das Filtrat eingedampft und der Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel mit Methylenchlorid/5 -10 % Methanol gereinigt. Man erhält 2,7 g der N-acetoacetylierten Verbindung, die in 100 ml Ethanol gelöst und mit 2,6 g fein gepulvertem Kaliumcarbonat versetzt wird. Das Gemisch wird 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt und schließlich eingedampft. Der Rückstand wird in 100 ml trockenem Dimethylformamid gelöst, die Lösung abgekühlt und mit 7 g Methyljodid versetzt. Man rührt das Gemisch 1 Stunde bei 0 °C und 30 Stunden bei Raumtemperatur. Das Dimethylformamid wird abdestilliert, der Rückstand in Wasser/Essigsäureethylester gelöst. Die Essigesterphase wird abgetrennt, getrocknet und eingedampft. Das Produkt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Methylenchlorid/Essigsäureethylester 20:1 gereinigt.

Man erhält 0,8 g 3-Acetyl-4-Chlor-2-methoxy-pyrazolo-[1,5-a]pyridin, das analog Beispiel 3 nitrosiert und reduziert wird.

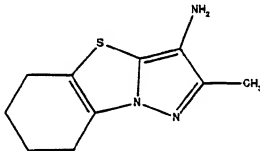
Ausbeute: 0,3 g der Titelverbindung

Fp. 200-230 °C (Zers.)

DC (Kieselgel, Methylenchlorid/Essigsäureethylester 1:1): R<sub>f</sub> = 0,6

#### Beispiel 15

#### 3-Amino-2-methyl-5,6,7,8-tetrahydro-pyrazolo-(3,2-b)-benzothiazol-hydrochlorid



15,1 g Acetamid und 21,3 g Phosphorpentasulfid werden in 32 ml absolutem Toluol suspendiert und unter Rühren mit 5 ml eines Gemisches aus 85 g 2-Bromcyclohexanon und 40 ml absolutem Toluol versetzt. Man erhitzt auf 75-80 °C und gibt den Rest der Bromketonlösung zu. Das Gemisch wird 10 Minuten unter Rückfluß gekocht, abgekühlt und mit 2 N Natronlauge auf pH 8-9 gestellt. Man extrahiert mit Essigsäureethylester, wäscht die organische Phase mit Wasser, trocknet und dampft ein. Der Rückstand wird im Vakuum destilliert. Man erhält 14,4 g 2-Methyl-4, 5,6,7-tetrahydrobenzothiazol Kp. 62 °C/0,5 mm Hg

15,2 g 2-Methyl-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazol werden in ca. 10 ml Methylenchlorid gelöst, die Mischung abgekühlt und mit 30 mMol einer Methylenchloridlösung von O-p-Toluolsulfonylhydroxylamin

versetzt. Man rührt 2 Stunden im Eisbad und fällt das Produkt durch Zugabe von Ether aus. Man erhält 6,4 g (94 % der Theorie) N-Amino-2-methyl-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazolium-p-toluolsulfonat mit Fp. 127-140 °C.

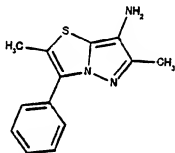
15,3 g, 2 g der in 15,2 erhaltenen N-Aminoverbindung werden zusammen mit 4,7 g Natriumacetat und 16 ml Acetanhydrid auf 140 °C (Badtemperatur) erhitzt. Nach 1 Stunde wird das Gemisch eingedampft, der Rückstand in Wasser/Methylenchlorid gelöst, mit Soda alkalisch gestellt und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Das Produkt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Essigsäureethylester/Ligroin (1:2) gereinigt. Man erhält 2,1 g (50 % der Theorie) 3-Acetyl-2-methyl-5,6,7,8-tetrahydropyrazolo-[3,2-b]-benzothiazol mit Fp. 90-92 °C.

15,4 Die in 15,3 erhaltene Verbindung (1,4 g) wird analog Beispiel 3 nitrosiert und die Nitrosoverbindung reduziert. Man erhält 1,3 g der Titelverbindung mit Fp 239-240 °C (Zers.).

DC (Kieselgel, Essigsäureethylester): R<sub>f</sub> = 0,5

#### Beispiel 16

#### 3-Amino-2,5-dimethyl-6-phenyl-pyrazolo-[3,2-b]-thiazolhydrochlorid

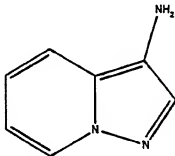


Analog Beispiel 15 erhält man, ausgehend von α-Brompropiofenon die Titelverbindung mit Fp. 252-254 °C (Zers.)

DC (Kieselgel, Essigsäureethylester): R<sub>f</sub> = 0,6

#### Beispiel 17

#### 3-Amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin-hydrochlorid



17,1 8,2 g Pyrazolo-[1,5-a]-pyridin (Ann. Chem. 498 (1977)) werden in 6 N Salzsäure (30 ml) gelöst, die Lösung auf 0 °C gekühlt und dazu langsam eine Lösung von 6,9 g Natriumnitrit in 30 ml Wasser getropft. Nach 1 Stunde ist die Nitrosierung beendet. Man setzt ca. 100 ml Wasser zu und extrahiert mehrfach mit Essigsäureethylester. Die organische Phase wird getrocknet und eingeeengt. Man erhält 9,6 g 3-Nitroso-Pyrazolo-[1,5-a]-pyridin.

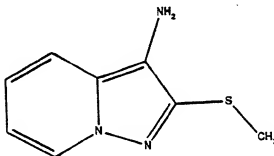
17,2 9 g der oben erhaltenen Nitrosoverbindung werden in eine Lösung von 22 g Zinn(II)-chlorid-Dihydrat in 180 ml konzentrierter Salzsäure eingetragen. Die Reaktionsmischung wird 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und zur Vervollständigung der Reduktion mit 8 g Zinn (II)-chlorid Dihydrat in 30 ml konzentrierter Salzsäure versetzt.

Die Suspension wird auf ca. 150 g Eis gegossen, mit Natriumhydroxid auf pH 12 gestellt und rasch mit Essigsäureethylester extrahiert. Die Essigesterphase wird getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird in ca. 350 ml Ether gelöst und mit etherischer Chlorwasserstoffsäure versetzt. Der ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. Man erhält 11,3 g (100 % der Theorie) der Titelverbindung mit Fp. 228-232 °C

DC (Kieselgel, Essigsäureethylester/Methanol 9:1): Rf = 0,52

#### Beispiel 18

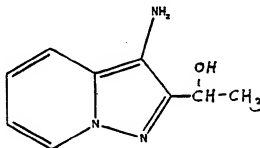
#### Herstellung von 3-Amino-2-methylthio-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin-hydrochlorid



4 g 2-Methylthio-3-nitro-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin (Heterocycles 6, 379 (1977), Chem. Pharm. Bull. 25, 1528 (1977)) werden in 200 ml konzentrierter Salzsäure gelöst und mit 20 g Zinn(II)-chlorid-Dihydrat versetzt. Nach einer Stunde werden nochmals 15 g Zinn(II)-chlorid-Dihydrat, 15 ml konzentrierte Salzsäure und 200 ml Wasser zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Reaktionszeit wird die Mischung auf Eis gegossen, die gelbe Lösung mit Natriumhydroxid alkalisch gestellt und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Ethanol gelöst und mit etherischer Chlorwasserstoffsäure versetzt, um das Hydrochlorid zu bilden. Man erhält 3,9 g (95 % der Theorie) der Titelverbindung mit Fp. 226 °C. DC (Kieselgel, Methylenchlorid/tert. Butylmethylether 2:8): Rf = 0,6.

#### Beispiel 19

#### R,S-3-Amino-2-(1-hydroxyethyl)-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin-hydrochlorid

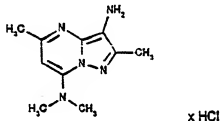


25 g N-Aminopyridin-hydrojodid werden in 250 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und unter Rühren mit 17,5 g Kaliumcarbonat versetzt. Anschließend tropft man unter Rühren 20,5 g R,S-2-Hydroxy-5-oxo-butan-3 (J. Chem. Soc. Perkin I 1908 (1972)) zu. Die Mischung erwärmt sich dabei und wird über Nacht stehengelassen. Nach Zugabe von 1,25 l Wasser wird mehrfach mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden getrocknet und eingedampft. Das verbleibende Öl wird mit etwas Ether verdünnt. Die nach einiger Zeit ausgefallenen Kristalle werden abgesaugt. Man erhält 9,8 g (42 % der Theorie) R,S-3-Acetyl-2-(1-hydroxyethyl)-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin (Rf (Kieselgel, Methylenchlorid/Essigsäureethylester 1:1) = 0,35), das analog Beispiel 3 nitrosiert wird. Die Nitrosoverbin-

ung wird analog Beispiel 8 mit Palladium/Kohle/Hydrazinhydrat reduziert. Man erhält 6,8 g der Titelverbindung, deren Kristalle 1,8 Mol HCl enthalten und bei 229-231 °C (Zers.) schmelzen.  
 $R_f$  (Kieselgel, Essigsäureethylester/Methanol 3:1) = 0,65

#### Beispiel 20

##### 3-Amino-2,5-dimethyl-7-(dimethylamino)-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin-hydrochlorid

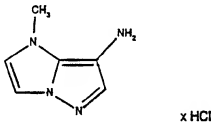


#### 20.1

1,6 g 2,5-Dimethyl-7-hydroxy-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin werden mit 16,6 ml Phosphoroxychlorid und 0,8 ml N,N-Dimethylanilin 40 min unter Rückfluß erhitzt. Das überschüssige Phosphoroxychlorid wird abdestilliert und der Rückstand auf Eis gegossen. Man extrahiert mit Methylchlorid, wäscht die organische Phase mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung, trocknet und engt ein. Der Rückstand wird in 28 ml Ethanol gelöst und mit 2 g einer 40proz. Lösung von Dimethylamin in Wasser versetzt. Die Mischung wird 2,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, eingedampft und der Rückstand über Kieselgel mit Essigsäureethylester chromatographiert. Man erhält 0,86 g (46 % der Theorie) 2,5-Dimethyl-7-(N,N-dimethylamino)-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin das analog Beispiel 3 nitrosiert wird. Die Nitrosoverbindung wird analog Beispiel 8 mit Palladium/Kohle/Hydrazinhydrat reduziert. Man erhält 0,8 g der Titelverbindung (Kieselgel, Chloroform/Methanol/ Methylalkylketon/Eisessig/Wasser = 75:35:25:5:8).

#### Beispiel 21

##### 3-Amino-4-methyl-pyrazolo-[1,5-a]-imidazol-hydrochlorid



#### 21.1

Analog dem in "Organikum" (VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin) auf S. 514/515 beschriebenen Verfahren setzt man 65 g Ethoxymethylcyanessigsäureethylester mit 55 g 2,2-Diethoxyethylhydrazin um und erhält 100,2 g 5-Amino-1-(2,2-diethoxyethyl)-pyrazol-4-carbonsäure, die in 4 l Ethanol gelöst und mit 2 l 20proz. Schwefelsäure versetzt wird. Man erhitzt 3 Stunden unter Rückfluß und neutralisiert durch Zugabe von festem Natriumbicarbonat. Von ausgefallenem Salz wird abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird mehrfach mit siedendem Methylchlorid ausgezogen. Die Filtrate werden vereinigt. Man erhält 58,2 g (86 % der Theorie) Pyrazolo-[1,5-a]-imidazol-3-carbonsäureethylester, vom Fp. 126-127 °C. ( $R_f$  = 0,64, Essigsäureethylester, Kieselgel)

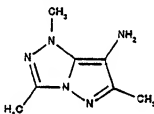


21.2

18,7 g des oben erhaltenen Carbonsäureesters werden in 190 ml Dimethylformamid gelöst und mit 17 g p-Toluolsulfonsäuremethylester versetzt. Unter Rühren werden 3,98 g Natriumhydrid (55proz.) portionsweise eingetragen. Man rührt 30 Minuten bei Raumtemperatur, gießt die Mischung auf Eis/Wasser und extrahiert mit Essigsäureethylester. Man erhält 21,9 g (100 %) des 4-Methylpyrazolo-[1,5-a]imidazol-3-carbonsäureethylesters, der durch Kochen in 600 ml konzentrierter Salzsäure verseift wird. Gleichzeitig decarboxyliert die entstehende Carbonsäure und man erhält 16,7 g (83 % der Theorie) 4-Methylpyrazolo-[1,5-a]imidazol-dihydrochlorid ( $R_f = 0,39$ , Kieselgel, Methylenchlorid mit 5 Vol.-% Methanol).

21.3

12,8 g Anilin werden in einer Lösung von 12,8 ml konzentrierter Schwefelsäure in 64 ml Wasser durch Zugabe einer Lösung von 9,5 g Natriumnitrit in 42 ml Wasser diazotiert. Die Lösung wird durch Zugabe von NaOH auf pH 5 gestellt und bei  $5 - 10^\circ \text{C}$  tropfenweise mit einer Lösung von 16,5 g des oben erhaltenen 4-Methylpyrazolo-[1,5-a]imidazol-dihydrochlorids in 165 ml Wasser und 14 ml Eisessig versetzt. Man rührt 1 Stunde bei  $5 - 10^\circ \text{C}$  und 3 Stunden bei Raumtemperatur und saugt dann den ausgefallenen Niederschlag ab. Man erhält 12 g 4-Methyl-3-phenylazo-pyrazolo-[1,5-a]imidazol das analog Beispiel 10.3 mit Natriumdithionit reduziert und analog Beispiel 13.3 gereinigt wird. Man erhält 3,3 g 3-Amino-4-methylpyrazolo-[1,5-a]imidazol-hydrochlorid. Fp.  $210^\circ \text{C}$  (Zers.)  $R_f = 0,23$ , Kieselgel, Essigsäureethylester/Aceton/Eisessig/Wasser = 50:25:12,5:12,5).

Beispiel 223-Amino-2,4,6-trimethyl-pyrazolo-[3,2-c]-s-triazol-hydrochlorid

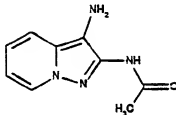
x HCl

22.1

Ausgehend von 4-Ethoxycarbonyl-3-methyl-pyrazol-5-ylhydrazin (Chem. Ber. 89, 2552 (1956)) stellt man wie in DE-A-1810462 (Beisp. 6) beschrieben 2,6-Dimethyl-4H-pyrazolo-[3,2-c]-s-triazol-3-carbonsäureethylester her, der vor der sauren Verseifung analog Beispiel 10.1 methyliert wird. Als Zwischenprodukt erhält man so 2,4,6-Trimethyl-pyrazolo-[3,2-c]-s-triazol-3-carbonsäureethylester ( $R_f = 0,52$ ; Kieselgel, Essigsäureethylester/Ligroin = 1:1), der durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure verseift und gleichzeitig decarboxyliert wird. Man erhält 2,4,6-Trimethyl-pyrazolo-[3,2-c]-s-triazol ( $R_f = 0,24$ , Kieselgel, Essigsäureethylester/Ligroin = 1:1) als schwach gelbliches Öl, das nach einiger Zeit kristallisiert.

22.2

Analog Beispiel 13.2 und 13.3 wird das oben erhaltene Produkt mit p-Methoxybenzoldiazoniumsalz umgesetzt, reduziert und das Produkt gereinigt. Man erhält die Titelverbindung. Fp.  $240^\circ \text{C}$  ( $R_f = 0,50$ , Kieselgel, Essigsäureethylester/Aceton/Eisessig/Wasser = 50:25:12,5:12,5).

Beispiel 232-Acetamido-3-amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin-hydrochlorid

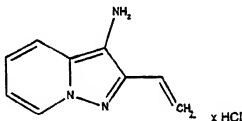
x HCl

4 g 2-Acetamido-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin (Chem. Pharm. Bull. 21, 2146 (1973)) werden analog Beispiel 3 nitrosiert. Die Nitrosoverbindung wird analog Beispiel 8 mit Palladium/Kohle/Hydrazinhydrat reduziert. Man erhält 3,9 g (67 % der Theorie) 2-Acetamido-3-amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin-hydrochlorid vom Fp. 255-259 °C (Zersetzung).

Rf = 0,5; Kieselgel, Essigsäureethylester/Aceton/Eisessig/ Wasser = 50:25:12,5:12,5

#### Beispiel 24

##### 2-Vinyl-3-amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin-hydrochlorid

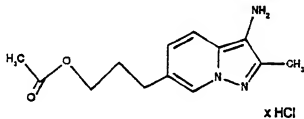


25 g R,S-3-Acetyl-2-(1-hydroxyethyl)-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin (aus Beispiel 22) werden mit 50 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und bei 95 °C Badtemperatur 2 Stunden erhitzt. Die Mischung wird auf viel Eis gegossen, mit NaOH alkalisch gestellt und mit Essigsäureethylester extrahiert. Das Rohprodukt wird über Kieselgel mit Ligroin/Essigsäureethylester (95:5 bis 90:10) chromatographiert. Man erhält 3,4 g 2-Vinyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin (Rf = 0,6; Kieselgel, Ligroin/Essigsäureethylester = 3:1), das analog Beispiel 21.2 mit Phenylidiazoniumsalz umgesetzt, reduziert und gereinigt wird. Man erhält die Titelverbindung.

Rf = 0,65; Kieselgel, Ligroin/Aceton/Eisessig = 50:45:5

#### Beispiel 25

##### 6-(3-Acetoxypropyl)-3-amino-2-methyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin

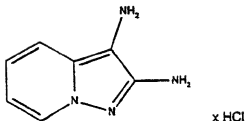


Analog Beispiel 12 erhält man durch Reduktion von 6-(3-Acetoxypropyl)-2-methyl-3-nitro-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin (Synthesis S. 673 (1982)) die Titelverbindung.

Rf = 0,21 (Kieselgel, Methylenchlorid/Methanol = 90:1)

#### Beispiel 26

##### 2,3-Diamino-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin-dihydrochlorid

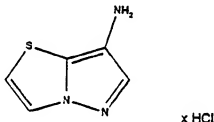


2,66 g 2-Amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin (Chem. Pharm. Bull. 21, 2146 (1973)) werden analog Beispiel 13.2 mit p-Methoxy-benzoldiazoniumsalz umgesetzt.

Die entstandene Azoverbindung wird analog Beispiel 10.3 mit Natriumdithionit reduziert und das Rohprodukt analog Beispiel 13.3 gereinigt. Man erhält die Titelverbindung vom Fp. 190° C ( $R_f = 0,6$ ; Kieselgel, Ligroin/Aceton/Eisessig = 60:40:1).

#### Beispiel 27

##### 3-Amino-pyrazolo-[3,2-b]-thiazol-hydrochlorid



#### 27.1

80 g des Kaliumsalzes der Dithiocarbazinsäure werden in 400 ml Dimethylformamid bei 50° C Badtemperatur 12 Stunden mit 60 ml Bromacetaldehyddiethylacetal umgesetzt. Das Gemisch wird eingedampft, die verbleibende Emulsion mit 500 ml Wasser versetzt und das Produkt mit Ether extrahiert. Das Rohprodukt wird durch Chromatographie über Kieselgel (Ether/Ligroin = 6:4) gereinigt. Man erhält 20,9 g des Dithiocarbazinsäure-(2,2-diethoxyethyl)esters.

#### 27.2

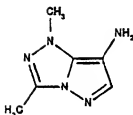
17,75 g des oben erhaltenen Carbazinsäureesters und 11,3 g Formyl-chloressigester werden in 250 ml Ethanol gelöst und 2 Stunden auf 50° C erhitzt. Die Mischung wird eingeeengt, mit Wasser versetzt und das Produkt mit Ether extrahiert. Die Etherphase wird getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird in 300 ml ethanolischer Salzsäure 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und das Reaktionsprodukt mit Essigsäureethylester extrahiert. Zur Reinigung wird über Kieselgel mit Essigsäureethylester/ Ligroin = 1:1 chromatographiert. Man erhält 6,5 g Pyrazolo-[3,2-c]-thiazol-3-carbonsäureethylester,  $R_f = 0,65$ ; Toluol/Dioxan/Eisessig = 72:20:8

#### 27.3

5,8 g des oben erhaltenen Esters werden in einem Gemisch aus 300 ml 3 N Salzsäure und 15 ml Dioxan 7 Stunden unter Rückfluß erhitzt, wobei alle zwei Stunden jeweils 15 ml konzentrierter Salzsäure zugegeben werden. Die Reaktionsmischung wird durch Zugabe von NaOH auf pH 8 gestellt und mehrfach mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach dem Trocknen und Einengen der organischen Phase erhält man 3 g Pyrazolo-[3,2-c]-thiazol in Form eines gelblichen Öls. Dieses Produkt wird analog Beispiel 3 nitrosiert und reduziert. Man erhält 3,4 g der Titelverbindung als Dihydrochlorid vom Fp. 170° C (Zersetzung),  $R_f = 0,68$ ; Kieselgel, Essigsäureethylester/Aceton/Eisessig/Wasser = 50:25:12,5:12,5

#### Beispiel 28

##### 3-Amino-4,6-dimethyl-pyrazolo-[3,2-c]-s-triazol-hydrochlorid



x HCl

28.1

24,4g 3-Amino-pyrazol-4-carbonsäureethylester (Organikum, S. 514, VEB Verlag der Wissenschaften, Berlin) werden in 100 ml konzentrierter Salzsäure suspendiert und bei 0 - 5° C durch Zugabe einer Lösung von 10,35 g Natriumnitrit in 50 ml Wasser diazotiert. Danach gibt man eine Lösung von 100 g Zinn(II)-chlorid in 100 ml konzentrierter Salzsäure zu und rührt die Mischung noch 2 Stunden im Eisbad. Der gelbe Niederschlag wird abfiltriert, in 150 ml Wasser gelöst und mit 20 ml Acetanhydrid versetzt. Die Mischung wird auf 80° C Badtemperatur erhitzt und portionsweise während 2 Stunden mit insgesamt 25 g Natriumbicarbonat versetzt.

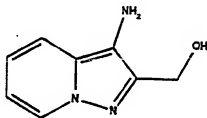
Die neutrale Lösung wird dann 24 Stunden kontinuierlich mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach dem Trocknen und Einengen der organischen Phase erhält man 17 g 3-Acethydrazinopyrazol-4-carbonsäureethylester:  $R_f = 0,33$ , Kieselgel, Aceton/ Methylenchlorid/Eisessig = 50:45:5), der mit Phosphoroxychlorid analog dem in DE-A 1810462 (Beispiel 6) beschriebenen Verfahren cyclisiert wird. Man erhält 4,8 g (32 % der Theorie) 6-Methyl-pyrazolo-[3,2-c]-s-triazol-3-carbonsäureethylester ( $R_f = 0,70$ ; Kieselgel, Toluol/Essigsäureethylester/Methanol = 2:1:1).

28.2

Analog Beispiel 10.1 wird der oben erhaltene Heterocyclus methyliert und das Produkt durch Chromatographie über Kieselgel mit Essigsäureethylester/Ligroin = 2:1 gereinigt. Durch 6stündiges Erhitzen mit 6 N Salzsäure wird der Ester verseift und die als Zwischenprodukt entstehende Carbonsäure decarboxyliert. Die Säure wird durch Zugabe von Natriumcarbonat neutralisiert und das Produkt mit Essigsäureethylester extrahiert. Man erhält 1,1 g öliges 4,6 Dimethyl-pyrazolo-[3,2-c]-s-triazol ( $R_f = 0,26$ ; Kieselgel, Essigsäureethylester/Ligroin = 1:1).

28.3

Der oben erhaltene Heterocyclus wird analog Beispiel 3 nitrosiert und die Nitrosogruppe analog Beispiel 8 mit Palladium/Kohle/Hydrazin reduziert. Man erhält die Titelverbindung als Hydrochlorid vom Fp. 190° C (Zersetzung)  $R_f = 0,53$ ; Kieselgel, Essigsäureethylester/Aceton/Eisessig/ Wasser = 50:25:12,5:12,5

Beispiel 293-Amino-2-hydroxymethyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin-hydrochlorid

x HCl

29.1

10,5 g Pyrazolo-[1,5-a]-pyridin-2-carbonsäureethylester (J. Het. Chem. 18, 1149 (1981)) werden in Tetrahydrofuran gelöst und zu einer Suspension von 5 g Natriumaluminiumhydrid in trockenem Tetrahydrofuran gegeben. Die Mischung wird 3 Stunden unter Rückfluß erhitzt, dann in eine Mischung aus Eis und Methanol gegossen. Man versetzt das Gemisch mit 100 ml 10prozentiger Ammoniumchloridlösung

und extrahiert mit Essigsäureethylester. Die organische Phase wird getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wird durch Chromatographie an Kieselgel mit Ligroin/Essigsäureethylester gereinigt.

Man erhält 7,3 g 2-Hydroxymethyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin als gelbes Öl ( $R_f = 0,49$ , Kieselgel, Essigsäureethylester)

29.2

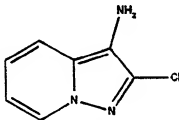
Die oben erhaltene Substanz wird analog Beispiel 3 nitrosiert und analog Beispiel 8 mit Palladium/Kohle/Hydrazinhydrat reduziert. Man erhält die Titelverbindung vom Fp.  $218^\circ \text{C}$ .  $R_f = 0,62$ ; Kieselgel, Essigsäureethylester/Methanol = 2:1

#### Beispiel 30

10

#### 3-Amino-2-chlor-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin-hydrochlorid

15



20

x HCl

25 2-Amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin (Chem. Pharm. Bull. 21, 2146 (1973) wird analog Beispiel 13.2 mit p-Methoxybenzoldiazoniumsalz umgesetzt. 0,53 g der erhaltenen 3-Azoverbindung werden in 10 ml 6 N Salzsäure suspendiert und bei  $+5^\circ \text{C}$  unter Rühren mit einer Lösung von 104 mg Natriumnitrit in 0,2 ml Wasser versetzt. Nach 30 Minuten gibt man eine kalte Lösung von 198 mg Kupfer(I)-chlorid in 6 ml 6 N Salzsäure zu und rührt die Mischung 40 Stunden bei Raumtemperatur. Die Mischung wird mit Wasser  
30 versetzt und 3 bis 4 mal mit Essigsäureethylester extrahiert. Man erhält nach der Reinigung des Rohproduktes durch Chromatographie über Kieselgel (Laufmittel: Essigsäureethylester/ Ligroin 1:1) 320 mg des 2-Chlor-3-(p-methoxyphenylazo)-pyrazolo-[1,5-a]-pyridins ( $R_f = 0,65$ ; Kieselgel, Essigsäureethylester/Ligroin = 1:1), das analog Beispiel 10.3 mit Natriumdithionit reduziert wird. Man erhält die Titelverbindung vom Fp.  $249 - 251^\circ \text{C}$  (Zersetzung)  $R_f = 0,2$ ; Kieselgel,  
35 Essigsäureethylester/Ligroin = 1:1

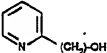
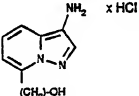
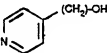
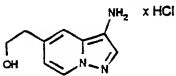
#### Beispiel 31

Analog Beispiel 17 erhält man ausgehend von substituierten Pyridinen die in der nachfolgenden Tabelle  
40 angegebenen Verbindungen.

45

50

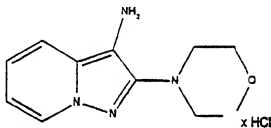
55

Ausgangsprodukt	Produkt	Fp.	R <sub>f</sub>
31.1 		208 °C	0.18 <sup>1)</sup>
31.2  Chem.Ber. 89, 2896 (1956)		212 °C	0.23 <sup>1)</sup>

1) Essigester/ Methanol 9:1

#### Beispiel 32

#### 3-Amino-2-morpholino-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin-hydrochlorid



2-Amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin (Chem. Pharm. Bull. 21, 2146 (1973)) wird analog Beispiel 13.2 mit p-Methoxybenzoldiazoniumsalz umgesetzt. 4 g der Azoverbindung werden in 100 ml Dimethylformamid gelöst und mit 5,33 g  $\beta,\beta'$ -Dibromdiethylether und 2 g Natriumhydrid (55proz.) versetzt. Man rührt das Gemisch 1,5 Stunden bei Raumtemperatur und setzt Wasser und Essigsäureethylester zu. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase nochmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird mit Hexan verrieben. Man erhält 4,75 g 3-(4-Methoxyphenyl)-azo-2-morpholino-pyrazolo-[1,5-a]-pyridin ( $R_f$  = 0,7, Kieselgel, Essigsäureethylester/Methylencchlorid = 1:1).

Die Azoverbindung wird analog Beispiel 13.3 mit Zink in Eisessig reduziert, gereinigt und die t-Butoxycarbonylgruppe mit HCl im Ethanol abgespalten. Man erhält 2,43 g der Titelverbindung vom Fp. 105 °C (Zersetzung),  $R_f$  = 0,4 (Kieselgel, Essigsäureethylester).

#### Beispiel 33

#### Bestimmung von Wasserstoffperoxid in wässriger Lösung.

Reagenzlösungen:

Lösung A

12 mg Peroxidase (= 3000U)

5 1 ml 0,1 n Phosphatpuffer, pH 8

Lösung B

53.6 mg 2,4,6-Tribromhydroxybenzoesäure

1 ml 0,1 n Phosphatpuffer, pH 8

10

Lösung C

32,1 mg N-Methyl-N-phenyl-amino-methanphosphonsäurehydrochlorid (hergestellt gemäß EP-A-0 175 250)

1 ml 0,1 n Phosphatpuffer, pH 8

15

4,8 x 10<sup>-7</sup> Mol eines erfindungsgemäß anwendbaren Pyrazoloderivates werden gegebenenfalls unter  
Zuhilfenahme von wenig Methanol, Aceton oder Dimethylformamid in ca. 5-9 ml 0,1 n Phosphatpuffer pH 8  
gelöst. Dazu gibt man 50 µl der Lösung A und je nach dem gewünschten Kuppler entweder 200 µl der  
Lösung B oder C. Schließlich fügt man noch 20 µl einer 0,012 molaren Lösung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Wasser zu, füllt  
mit dem Puffer auf 10 ml auf und mischt die Lösungen gut durch. Die Lösungen werden in 1 cm Küvetten  
vermessen. In der folgenden Tabelle 1 werden die Wellenlängen und Extinktionen bei λ<sub>max</sub> der  
entstandenen Farbstoffe aufgeführt.

20

25

30

35

40

45

50

55

Tabelle 1

Substanz aus Beispiel Nr.	Kupplungskomponente TBHB 1)		Kupplungskomponente Anilin 2)	
	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Ext. 3)	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Ext. 3)
1	568	69300	620	78200
2	536	18000	578	12600
3	622	28900	657	34800
4	572	30400	613	35600
5	557	36300	587	41900
6.1	568	39300	615	48800
6.2	628	19400	658	23000
6.3	602	22200	634	32600
6.4	587	7600	628	13300
7	626	30100	674	113300
8	613	13700	638	24200
9	617	45200	668	55500
10	613	39600	652	53300
11	504	10200	539	12600
12	542	39600	596	42000
13	612	25000	657	32600
14	577	42400	623	39300
15	594	34400	638	34000
16	592	34200	638	27400
17	572	53100	606	74600
18	635	31600	675	84600
19	613	22670	650	18160
20			639	
21	588	76290	633	94150
22	607	9300	648	42350
23	638	61500	658	66900
24	629	17950	660	28850

1) TBHB = 2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzoesäure

2) Anilin = N-Methyl-N-phenyl-aminomethanphosphonsäure Hydrochlorid

3) Ext = Extinktion in [Liter/Mol cm<sup>2</sup>]



Tabelle 1 (Fortsetzung)

Substanz aus Beispiel Nr.	Kupplungskomponente TBHB 1)		Kupplungskomponente Anilin 2)	
	$\lambda_{\max}$ [nm]	Ext 3)	$\lambda_{\max}$ [nm]	Ext. 3)
26	631	34620	683	35220
27	552	28940	585	39450
28	564	24210	604	41760
29	613	24870	648	37780
30	593	13990	631	22850
31.1	590	40970	623	51170
31.2	587	36950	619	46620
32	656	48450	709	134420

1) TBHB = 2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzoesäure

2) Anilin = N-Methyl-N-phenyl-aminomethanphosphonsäure Hydrochlorid

3) Ext = Extinktion in [Liter/Mol  $\text{cm}^2$ ]

Beispiel 345 Bestimmung von Creatinin:a) Indikatorsystem 2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzoesäure/Substanz aus Beispiel 410 Reagenz I:

100 mM Tris-Puffer, pH 7,9

200 mM Kaliumchlorid

15 0.25% Detergenz (Triton X 100®)

5 mM Natriumcholat

10 mM Ammoniumchlorid

20 5 mM Magnesiumchlorid

15 mM 2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzoesäure

15 U/ml Creatinin-imino-hydrolase (E.C. 3.5.4.21)

25 0.5U/ml N-Methylhydantoinase (DE-A-34 06 770)

3 U/ml Sarcosin-Oxidase (E.C. 1.5.3.1)

3 U/ml Peroxidase (E.C. 1.11.1.7)

30 Reagenz II:

35 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0

100 mM ATP

3 mM Substanz aus Beispiel 4

40 40 U/ml N-Carbamoylsarcosin-Hydrolase (DE-A-32 48 145)

Probematerial:

Wässrige Creatinin-Standardlösungen (2-20 mg/dl Creatinin)

45 Testansatz und Durchführung:

Wellenlänge:	569nm
Schichtdicke:	10 mm
Temperatur:	25 °C
Inkubationszeit:	10 min

55 Pippatierschema:

Reagenz I: 1.00 ml

Reagenz II: 50  $\mu$ lProbe: 20  $\mu$ l

Messung gegen Reagenzienleerwert (Wasser statt Standardlösung als Probe)

Ergebnis:

Standardkonzentration ( mg/dl )	Absorption ( mE )
2	92
4	194
6	272
8	368
10	472
12	565
14	658
16	753
18	841
20	974

b) Indikatorsystem N-Methyl-N-phenyl-aminomethanphosphonsäure (MPA)/Substanz aus Beispiel 4

Reagenz I:

Zusammenstellung wie bei Reagenz I in a), jedoch 2mM MPA (hergestellt gemäß EP-A-0 175 250) statt 15 mM 2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzoesäure

Reagenz II:

Zusammenstellung identisch mit Reagenz II in a)

Probematerial:

Wässrige Standardlösungen (2-20 mg/dl Creatinin)

Testansatz und Durchführung:

Wellenlänge: 620 nm

Schichtdicke, Temperatur, Inkubationszeit, Pipettierschema und Messung wie in a).

Ergebnis:

5

10

15

Standardkonzentration ( mg/dl )	Absorption ( mE )
2	61
4	125
6	184
8	249
10	307
12	369
14	429
16	491
18	554
20	615

20 c) Indikatorsystem N-Ethyl-N-3-sulfo-2-hydroxypropyl-m-anisidin (ADOS)/Substanz aus Beispiel 4

Reagenz I: Zusammensetzung wie bei Reagenz I in a), jedoch 2 mM ADOS (Chem. Pharm. Bull. 30, 2492 (1982)) statt 15 mM, 2,4,6-Tribrom-3-hydroxy-benzoesäure

Reagenz II: Zusammensetzung identisch mit Reagenz II in a)

25

Probematerial:

Wässrige Standardlösungen (2-20 mg/dl Creatinin)

Testansatz und Durchführung:

30

Wellenlänge: 598 nm

Schichtdicke, Temperatur, Inkubationszeit, Pipettierschema und Messung wie in a).

Ergebnis:

35

40

45

50

55

Standardkonzentration ( mg/dl )	Absorption ( mE )
2	48
4	107
6	165
8	227
10	280
12	338
14	386
16	450
18	500
20	565

Beispiel 35

Bestimmung von Glucose in Serum oder Vollblut mittels eines Testträgers

Die zum Nachweis erforderlichen Reagenzien werden in eine Filmbeschichtungsmasse gemäß EP-A-0 016 387 eingearbeitet:

0,2 Mol/l Phosphatpuffer, pH 5,5  
 0,2 mMol/l Substanz aus Beispiel 3  
 1,0 mMol/l Anilinmethanphosphonsäure  
 (gemäß EP-A-0 175 250)  
 1,0 KU/l Glucose-Oxidase  
 10,0 KU/l Peroxidase.

Die Filmmasse wird mit einer Schichtdicke von 150 µm auf Papier als einen porösen Träger aufgerollt. Zur Filmbildung wird die Masse ca. 30 Minuten bei 50 °C trocknen gelassen.

Zur Bestimmung der Glucosekonzentration (0 bis ca. 35 mmol/l) aus auf den Film aufgetragenem Serum bzw. Vollblut wird nach ca. 1 Minute umseitig mittels Photometer die Remission gemessen. Wie die nachstehende Wertetabelle erkennen läßt, ist eine präzise Ermittlung der Glucosekonzentration über eine vorher erstellte Calibrationskurve gut durchführbar.

Wertetabelle

Glucose (mg/dl)	Remission (%)
0	93
11	91
103	71
205	51
302	39
400	31
506	25
598	21

Beispiel 36

Bestimmung von Wasserstoffperoxid in wässriger Lösung

Reagenz-Lösungen:

1,75 mMol/l Substanz aus Beispiel 19  
 2,0 mMol/l Anilinmethanphosphonsäure  
 (gemäß EP-A-0 175 250)  
 1,25 KU/l Peroxidase (Aktivitätsbestimmung mit  
 Tetramethylbenzidin)  
 100 mMol/l Phosphatpuffer, pH 5,5

Zur Erstellung einer Kalibrationskurve werden in 1 cm-Küvetten 2,28 ml Phosphatpuffer vorgelegt und jeweils 100  $\mu$ l Substanz aus Beispiel 22 und Anilinomethanphosphonsäure sowie 10  $\mu$ l Peroxidase-Lösung zupipettiert. Die Probelösung erhält man durch Zugabe von 10  $\mu$ l einer definierten Wasserstoffperoxid-Lösung. Die Referenzlösung ergibt sich durch Zugabe des gleichen Volumens Phosphatpuffer. Jeweils 30 Sekunden nach Wasserstoffperoxid-Zugabe wird die Extinktion des durch oxidative Kupplung gebildeten Farbstoffs als Funktion der eingesetzten Menge Peroxid bei  $\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ nm}$  an einem Uvikon-Gerät bei 25 °C gemessen.

Die in nachstehender Tabelle zusammengefaßten Werte gehorchen über den gesamten Meßbereich dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden beträgt 0,99985. Die eingesetzten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösungen entsprechen Glucose-Konzentrationen im diagnostisch relevanten Bereich von 30 mg/dl bis 600 mg/dl.

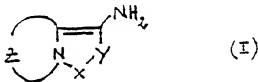
Tabelle:

Extinktionswerte des Kupplungsproduktes als Funktion der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration

	mMol/l $\text{H}_2\text{O}_2$	Extinktion
	1,74	0,132
	3,48	0,232
	6,96	0,448
	10,44	0,622
	13,92	0,858
	17,40	1,051
	20,88	1,253
	24,36	1,463
	27,84	1,635
	31,32	1,842
	34,80	2,061

#### Ansprüche

1. Verwendung eines Pyrazoloderivats gemäß der allgemeinen Formel I



in der  
X-Y NR<sup>1</sup>-CO oder N=CR<sup>2</sup> bedeutet,

wobei

R<sup>1</sup> Alkyl und

R<sup>2</sup> Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkylthio, Aryl, Aralkyl, gegebenenfalls jeweils substituiert durch Hydroxy, Dialkylphosphinyl, Carboxy, SO<sub>3</sub>H, PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, ein Salz eines dieser Säurereste oder/und Alkoxycarbonyl;

Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxycarbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist wobei, wenn Amino durch 2 Alkylreste substituiert ist, diese Reste auch zu einem Ring geschlossen sein können, der außer durch das N-Atom der Aminogruppe gegebenenfalls auch durch Sauerstoff, Schwefel oder ein weiteres Stickstoffatom unterbrochen sein kann, oder Amino gegebenenfalls durch ein oder zwei Acylgruppen, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, H<sub>2</sub>N-CO, Alkyl-, Aralkyl- oder/und Arylcarbonylgruppen substituiert ist; oder Wasserstoff, Carboxy, Alkoxycarbonyl, Carboxamido oder Halogen ist, und

Z NR<sup>3</sup>-N = N bedeutet,

wobei R<sup>3</sup> Alkyl oder Aralkyl ist oder

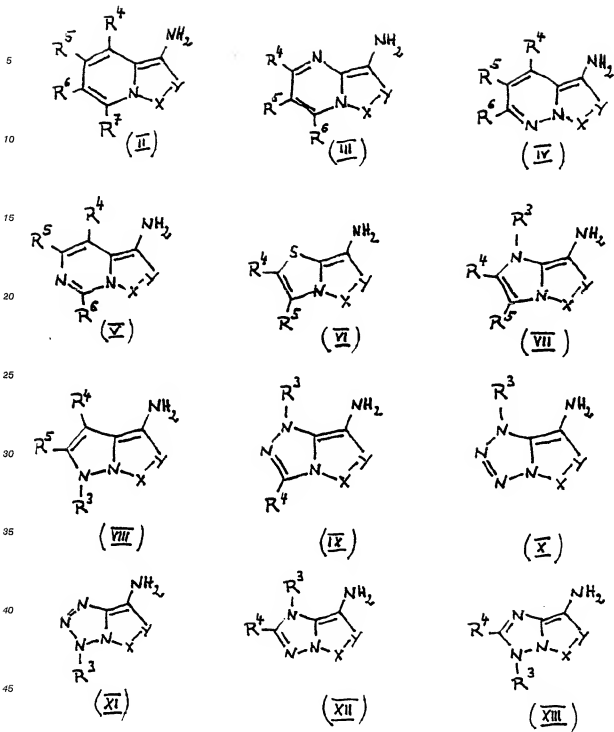
Z eine ungesättigte Kette mit 3 bis 5 Gliedern aus Stickstoffatomen oder aus Kohlenstoffatomen und gegebenenfalls einem oder mehreren Stickstoff- oder Schwefelatomen darstellt, wobei Kohlenstoffatome gegebenenfalls substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Aralkyl, Aryl, Carboxy, Carboxamido, Alkoxycarbonyl, Cyano, Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxycarbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist oder Halogen und wobei Stickstoffatome, die nicht über eine Doppelbindung gebunden sind, durch Alkyl oder Aralkyl substituiert sind oder zwei benachbarte Kettensubstituenten gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits

gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist

sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze zur kolorimetrischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid, wasserstoffperoxidbildenden Systemen, Peroxidase, peroxidatisch wirksamen Substanzen oder elektronenreichen aromatischen Verbindungen.

2. Verwendung eines Pyrazoloderivates gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Z mindestens eine Doppelbindung enthält, die in Konjugation zu der Doppelbindung oder zu dem N-Atom der allgemeinen Formel I steht.

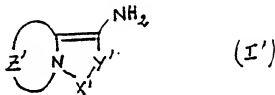
3. Verwendung eines Pyrazoloderivates gemäß einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es aus der Gruppe der Substanzen der allgemeinen Formeln II bis XIII



wobei X-Y und R<sup>3</sup> die gleiche Bedeutung wie in Anspruch 1 haben und R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> und R<sup>7</sup> gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Aryl, Aryl, Carboxy, Alkoxycarbonyl, Carboxamido, Cyano, Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxycarbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist oder Halogen bedeuten oder zwei benachbarte Reste gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist, sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze gewählt ist.



4. Verwendung eines Pyrazoloderivates gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es aus der Gruppe der Substanzen der allgemeinen Formel II, III, IV, VI, VII und IX sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze gewählt ist.
5. Verwendung eines Pyrazoloderivates gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß  
 $X-Y-N=CR^2$  bedeutet, wobei  
 $R^2$  die Bedeutung wie in Anspruch 1 hat.
6. Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxid bildenden Systemen, Peroxidase oder peroxidatisch wirksamen Substanzen mittels oxidativer Kupplung einer elektronenreichen aromatischen Verbindung mit einer heterocyclischen Verbindung, dadurch gekennzeichnet, daß als heterocyclische Verbindung ein Pyrazoloderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 eingesetzt wird.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als elektronenreiche aromatische Verbindung eine Substanz aus der Gruppe der Verbindungen, die mit p-Phenylendiamin eine oxidative Kupplung eingehen vermögen, eingesetzt wird.
8. Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxid bildenden Systemen, Peroxidase oder peroxidatisch wirksamen Substanzen durch oxidative Kupplung enthaltend eine elektronenreiche aromatische Verbindung und eine heterocyclische Verbindung, dadurch gekennzeichnet, daß die heterocyclische Verbindung ein Pyrazoloderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 ist.
9. Mittel gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die elektronenreiche aromatische Verbindung eine Substanz aus der Gruppe der Verbindungen ist, die mit p-Phenylendiamin eine oxidative Kupplung eingehen vermögen.
10. Verwendung eines Pyrazoloderivates gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung eines Mittels zur kolorimetrischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxid bildenden Systemen, Peroxidase oder peroxidatisch wirksamen Substanzen durch oxidative Kupplung.
11. Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung einer elektronenreichen aromatischen Verbindung durch deren oxidative Kupplung mit einer heterocyclischen Verbindung in Gegenwart eines Oxidationsmittels, dadurch gekennzeichnet, daß als heterocyclische Verbindung ein Pyrazoloderivat gemäß einem der Ansprüche 1 - 5 eingesetzt wird.
12. Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung einer elektronenreichen aromatischen Verbindung durch oxidative Kupplung enthaltend eine heterocyclische Verbindung und ein Oxidationsmittel, dadurch gekennzeichnet, daß die heterocyclische Verbindung ein Pyrazoloderivat gemäß einem der Ansprüche 1 - 5 ist.
13. Verwendung eines Pyrazoloderivates gemäß einem der Ansprüche 1 - 5 zur Herstellung eines Mittels zur kolorimetrischen Bestimmung einer elektronenreichen aromatischen Verbindung durch oxidative Kupplung.
14. Pyrazoloderivat der allgemeinen Formel I'



in der

$X'-Y'$   $NR^{1'}-CO$  oder  $N=CR^{2'}$  bedeutet,

wobei

$R^{1'}$

$R^{2'}$

Alkyl und

Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkylthio, Aryl, Aralkyl, gegebenenfalls jeweils substituiert durch Hydroxy, Dialkylphosphinyl, Carboxy,  $SO_3H$ ,  $PO_3H_2$ , ein Salz eines dieser Säurereste oder/und Alkoxycarbonyl;

Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxycarbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist wobei, wenn Amino durch 2 Alkylreste substituiert ist, diese Reste auch zu einem Ring geschlossen sein können, der außer durch das N-Atom der Aminogruppe gegebenenfalls auch durch Sauerstoff, Schwefel oder ein weiteres Stickstoffatom unterbrochen sein kann, oder Amino gegebenenfalls durch ein oder zwei Acylgruppen, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen,

$H_2N-CO$ , Alkyl-, Aralkyl- oder/und Arylcarbonylgruppen substituiert ist; oder Wasserstoff, Carboxy, Alkoxycarbonyl, Carboxamido oder Halogen ist, und

$Z'$   $NR^{3'}-N=N$  bedeutet,

wobei  $R^{3'}$  Alkyl oder Aralkyl ist oder

$Z'$

eine ungesättigte Kette mit 3 bis 5 Gliedern aus Stickstoffatomen oder aus Kohlenstoffatomen und gegebenenfalls einem oder mehreren Stickstoff- oder Schwefelatomen darstellt, wobei sämtliche Kohlenstoffatome der ungesättigten Kette Teil einer Doppelbindung sind und wobei Kohlenstoffatome gegebenenfalls substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Aralkyl, Aryl, Carboxy, Carboxamido, Alkoxycarbonyl, Cyano, Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxycarbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist oder Halogen und wobei Stickstoffatome, die nicht über eine Doppelbindung gebunden sind durch Alkyl oder Aralkyl substituiert sind oder zwei benachbarte Kettensubstituenten gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist, sowie gegebenenfalls ein entsprechendes Tautomer und dessen Salz unter der Bedingung, daß,

a) wenn  $X'-Y'$  gleich  $N=CR^{2'}$  mit  $R^{2'}$  gleich Alkyl oder Phenyl und

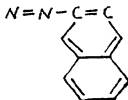
$Z'$  eine ungesättigte Kette aus 4 Kohlenstoffatomen ist, diese nicht unsubstituiert und nicht durch Alkyl, Alkoxy oder Halogen substituiert ist,

b) wenn  $Z'$  eine ungesättigte Kette aus vier Gliedern mit 3 Kohlenstoffatomen und einem Stickstoffatom am Ende der Kette bedeutet, so daß in Formel I' der Ring mit  $Z'$  einen Pyrimidinring bildet und ein oder mehrere Kohlenstoffatome substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Aryl, Alkoxycarbonyl oder Halogen und

$X'-Y'$  für  $N=CR^{2'}$  steht

$R^{2'}$  nicht Wasserstoff bedeutet,

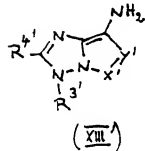
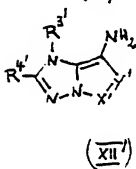
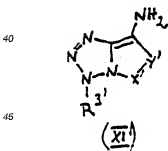
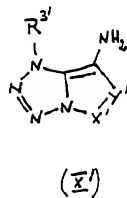
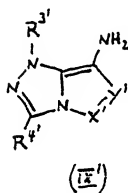
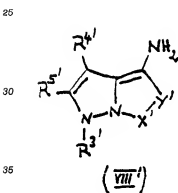
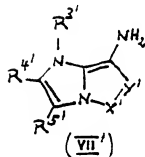
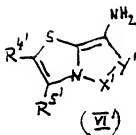
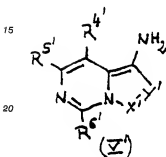
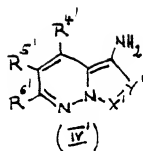
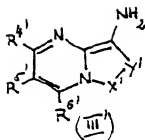
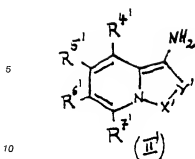
c) wenn  $Z'$



bedeutet, so daß in Formel I' der Ring mit  $Z'$  einen 1,2,4-Triazinring bildet und  $X'-Y'$  für  $N=CR^{2'}$  steht,  $R^{2'}$  nicht Methyl ist.

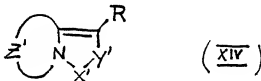
15. Pyrazoloderivat gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß  $Z'$  mindestens eine Doppelbindung enthält, die in Konjugation zu der Doppelbindung oder zu dem N-Atom der allgemeinen Formel I' steht.

16. Pyrazoloderivat gemäß einem der Ansprüche 14 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß es aus der Gruppe der Substanzen der allgemeinen Formel II' bis XIII'



50 wobei  
 X'-Y' und R<sup>3'</sup> die gleiche Bedeutung wie in Anspruch 14 haben und  
 R<sup>4'</sup>, R<sup>5'</sup>, R<sup>6'</sup> und R<sup>7'</sup> gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkylthio,  
 Aralkyl, Aryl, Carboxy, Alkoxy-carbonyl, Carboxamido, Cyano, Amino, das gegebenenfalls durch ein oder  
 zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxy-carbonylreste tragende  
 55 Alkylreste substituiert ist oder Halogen bedeuten oder zwei benachbarte Reste gegebenenfalls eine  
 Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist,  
 sowie gegebenenfalls ein entsprechendes Tautomer und dessen Salz  
 gewählt ist.

17. Pyrazoloderivat gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß es aus der Gruppe der Substanzen der allgemeinen Formeln II', III', IV', VI', VII' und IX', sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze gewählt ist.
18. Pyrazoloderivat gemäß einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß  $X'-Y' N = CR^{2'}$  bedeutet, wobei  $R^{2'}$  die Bedeutung wie in Anspruch 14 hat.
19. Verfahren zur Herstellung von Pyrazoloderivaten gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der allgemeinen Formel XIV



- in der  $X'-Y'$  und  $Z'$  die gleiche Bedeutung wie in Anspruch 14 haben und R Wasserstoff ist,
- a) durch Umsetzung mit Salpetersäure oder Salpetersäure im Gemisch mit Schwefelsäure und/oder Acetanhydrid in eine Verbindung der allgemeinen Formel XIV mit R gleich Nitro oder
- b) durch Reaktion mit salpetriger Säure in eine Verbindung der allgemeinen Formel XIV mit R gleich Nitroso oder
- c) durch Reaktion mit einem aromatischen Diazoniumsalz in eine Verbindung der allgemeinen Formel XIV mit R gleich Arylazo
- überführt und anschließend reduziert wird.